



HAL
open science

Etude des adaptations mitochondriales dans le muscle squelettique : importance de l'hormèse mitochondriale

Anna - Isabel Schlagowski

► **To cite this version:**

Anna - Isabel Schlagowski. Etude des adaptations mitochondriales dans le muscle squelettique : importance de l'hormèse mitochondriale. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ105 . tel-01239372

HAL Id: tel-01239372

<https://theses.hal.science/tel-01239372v1>

Submitted on 7 Dec 2015

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.



Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Année universitaire 2013/2014

N° attribué par la bibliothèque

Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Domaine : Physiologie et Biologie des Organismes, Populations Interactions

ETUDE DES ADAPTATIONS MITOCHONDRIALES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE : IMPORTANCE DE L'HORMESE MITOCHONDRIALE

Présentée et soutenue publiquement par

Anna-Isabel SCHLAGOWSKI

Le 23 septembre 2014

Membres du jury :

Rapporteur Externe :	Professeur Patrick MUCCI	Lille
Rapporteur Externe :	Docteur Cyril REBOUL	Avignon
Examineur Interne :	Professeur Laurent MONASSIER	Strasbourg
Directeur de Thèse :	Docteur François PIQUARD	Strasbourg
Membre invité (Co-Direct.):	Docteur Joffrey ZOLL	Strasbourg
Membre invité :	Professeur Bernard GENY	Strasbourg

REMERCIEMENTS

M. le Professeur Patrick MUCCI, M. le Professeur Laurent MONASSIER, M. le Docteur Cyril REBOUL, Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de juger mon travail et de faire le déplacement pour ma soutenance.

M. le Professeur Bernard GENY, je tiens à vous remercier pour m'avoir accueillie dans l'équipe "EA 3072" et pour m'avoir permis de me consacrer à plein temps à ce qui me passionne, la recherche. Merci de m'avoir soutenue et encouragée. Sans vos efforts personnels, cette thèse n'aurait certainement jamais abouti.

Je voudrais également remercier mon directeur de thèse, **François PIQUARD**, pour toute son aide. Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique (et notamment les statistiques), il a été là pour me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Cependant, je dois mes plus grands remerciements à mon Co-Directeur de thèse, **Joffrey ZOLL**, qui a su me motiver d'aller au bout de cette aventure. Merci de m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt "légères" que j'avais en arrivant dans le laboratoire. Merci pour m'avoir guidée, encouragée, conseillée, fait aimer mon métier. Tu m'as permis de me lever motivée, le cœur léger et l'esprit tranquille depuis le début de ma thèse. Très humblement, je voudrais te dire merci pour tout ton soutien pendant mes périodes de doutes et pour tes multiples encouragements répétés. Tu as su mettre en musique les paroles de ma composition scientifique.

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs suggestions ou contributions. Je pense ici en particulier à **Anne-Laure Charles, François Singh, Raphael Clere, Max Guillot, Isabelle Bentz et Fabienne Goupilleau**. Merci Anne-Laure de m'avoir pris sous tes épaules (expression allemande), de m'avoir guidé et toujours encouragé. Merci pour ta disponibilité 24h/24h et ta patience envers moi. Au cours de ces 4 années communes, tu es devenue non seulement une collègue, mais une véritable amie avec un cœur toujours ouvert pour moi. Désolée pour toutes les nuits courtes que je t'ai infligées. Merci également à François Singh,

mon deuxième cerveau, de toujours avoir été disponible, de m'avoir soutenu et ne jamais s'être moqué de moi, hein ?;) Mais, je te rappelle que tu n'es pas mieux : " *Comment on appelle ça encore ?... ah oui, le jus d'essuie glace (pour lave-glace;).*" Je terminerai avec Isabelle et Fabienne. Nos deux mains droites, voire nos mains tout court. Toutes nos études n'auraient jamais abouti sans elles. Merci tout plein à elles, nos "piliers" du laboratoire qui travaillent souvent dans l'ombre. Rendez-vous en 2016 à Rio ;)!

Merci du fond du cœur à toute l'équipe, c'est avec un grand pansement au cœur que je vous quitterai...

J'aimerais également remercier le service de physiologie et d'explorations fonctionnelles : **Professeure Anne Charloux, Docteur Stéphane Doutreleau, Docteur Evelyne Londsorfer, Docteure Monique Ostwald, Docteure Irina Enache, Docteur Di Marco Paola, Docteure Christine Pisteu, Docteur Samy Talha** ainsi que toutes les techniciennes.

J'aimerais remercier tout particulièrement **Laurence Rasseneur, Stéphane Dufour, Isabelle Logeart, Kouassi Blah Yao et Fabrice Favret** pour m'avoir donné les bases fondamentales. Je n'oublierai pas votre soutien et votre patience envers moi. Votre aide m'a été la plus précieuse.

Un grand merci à mes fidèles amies **Céline et Bérengère**. Depuis mon arrivée en France vous êtes devenues mes piliers et ma force pour avancer. Vous m'avez toujours soutenu malgré vos vies personnelles bien remplies. Je compte bien enfin passer un peu plus de temps en votre présence. Céline, je t'accompagnerai au bout de tes rêves. Compte sur moi pour t'encourager à mon tour. Bérengère, je te félicite pour tes deux petites merveilles. J'ai hâte de passer des moments avec ta petite famille merveilleuse.

Je remercie toutes les personnes extérieures avec qui j'ai collaboré et à ceux que j'ai oublié: veuillez me pardonner !! Aux étudiants futurs de notre laboratoire. N'oubliez jamais la devise du labo « *L'idée, c'est qu'en théorie, y a pas de problème* ».

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à **ma famille**, et en particulier à mes parents qui m'ont fait comprendre que: "Das Leben ist nicht nur ein Zuckerschlecken." Vous m'avez permis de m'envoler vers mon rêve à moi. Vous

m'avez laissé prendre mes responsabilités, tout en me rattrapant à chaque fois que j'avais perdu ma route. **Mes parents, mes deux frères d'amour**, malgré mon éloignement depuis de (trop) nombreuses années, votre intelligence, votre confiance, votre tendresse, et votre amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Je ne sais comment exprimer ma gratitude à ma famille autrement qu'en leur promettant de transmettre leurs valeurs et d'agir envers mes proches, comme ils l'auraient aimé. Je vous aime fort.

Mes derniers remerciements sont destinés à **mes trois amours de ma vie**. Vous êtes mon oxygène, mon souffle, mon énergie. Merci de me remplir de bonheur et de faire de moi la mitochondrie la plus épanouie.

Ainsi, je termine sur ta citation, mon petit ange de presque 5 ans: "*quand on met sa main sur le cœur, on devient plus fort.*" Merci pour toutes ces belles leçons de vie.

ETAT CIVIL

Anna-Isabel SCHLAGOWSKI

Lieu de naissance: Lüneburg en Allemagne (Niedersachsen)

Nationalité: franco/allemande

FORMATION

- 2011-2014 **Thèse de Science et Vie à Strasbourg (Doctorat en Physiologie de l'exercice)**
Laboratoire : « Mitochondrie, stress oxydant et protection musculaire, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg »
- 2011 **Master Recherche 2 « Expertise des Activités Physiques et Sportives, physiologie de l'exercice »** Parcours: Sport, conduite motrice et performance, Faculté des Sciences du Sport, UDS (*Majeur de promotion, mention BIEN*)
- 2010 **Master Professionnel 1 « Entraînement, Préparation Physique et Management du Sportif »** à l'Université de Strasbourg (*Majeur de promotion, mention AB*)
- 2009 **Licence STAPS** à l'Université Marc Bloch de Strasbourg, spécialité: Entraînement sportif (*Majeur de promotion, mention AB*)
- 2004 **Baccalauréat** au Gymnasium Fritz Reuter Schule Bad Bevensen (Allemagne)

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

EXPERIENCE/STAGES

- 2011-2014 Nommé « **Assistant Hospitalo-Universitaire** » dans le service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles à Strasbourg, discipline : physiologie
- 2011 **Pré-sélectionnée pour le concours d'attribution des contrats doctoraux 2011** de l'école doctorale des Sciences de la vie de l'université de Strasbourg (47 candidats sur 180 diplômés retenus pour passer le concours).
- 2009-2012 Nommé **Préparateur Physique** au TC Reichstett (niveau régional/national)
- 2009 **Entraîneur Stagiaire au pôle demi-fond de Strasbourg** (optimisation de la performance sportive en athlétisme) (50h)
- 2008-2009 **Entraîneur Stagiaire à l'association AKINEO** (prévention diabète type 2, insuffisance cardiaque, surpoids ou obésité) (50h)
- 2008 **Stagiaire à l'école primaire** de la Robertsau (prise en charge des cours d'EPS et d'allemand) (50h)

ENSEIGNEMENTS

1) Travaux dirigés et pratiques à la Faculté de Médecine

- 2011-2014 **Enseignement dirigé de physiologie** au 1^{er} cycle des études médicales : « Etude de l'appareil contractile, des compartiments liquidiens, des transferts membranaires » (PACES : 25 heures/an)
- 2011-2014 **Enseignement pratique de physiologie cardio-vasculaire** au 2^{ème} cycle des études médicales : « Loi de Poiseuille, loi de Starling, loi de Laplace » (PACES: 25 heures/an).
- 2011-2014 **Enseignement dirigé de physiologie** au 1^{er} cycle des études médicales : « Etude de l'appareil contractile, bioenergétique, des transferts membranaires » (PACES: 25 heures/an)
- 2011-2014 **Enseignement pratique de physiologie** au 1^{er} cycle des études médicales : « Physiologie de l'exercice » (PACES: 20 heures/an)

2011-2014	Enseignement dirigé de physiologie au 1 ^{er} cycle des études médicales : « Equilibre acido-basique » (PCEM2: 20 heures/an)
2011-2014	Enseignement pratique de physiologie au 3 ^{eme} cycle des études médicales : « Physiologie de l'exercice » (DCEM1: 15 heures/an)
2011-2014	Enseignement dirigé de physiologie au 2 ^{eme} cycle des études médicales : « Le système digestif » DCEM1: 20 heures/an)

→ **Bilan enseignement** : 280h en PACES / 130h en PCEM 2/ 45h en DCEM 1

EXPERIENCES DIVERSES

- Plus jeune candidate sur la liste d'élection pour le Parlement Européen en 2004 (place 52)
- Candidature pour le Parlement Européen, déléguée au congrès européen à Bruxelles en vue des sélections, tournée de promotion en présence de différents députés nationaux et internationaux (2003-2004).
- Divers défilés de mode pour Sport 2000, Bonnie Doon, Haute coiffure.

RESULTATS SPORTIFS

2005-2010	Athlète de haut-niveau à l'Université de Strasbourg (Marc Bloch). Divers palmarès aux championnats de France Universitaires (FFSU) en individuel et par équipes.
2009-2010	Finaliste aux championnats de France nationaux sur 800m.
2009-2010	Championne de France Universitaire sur 800m individuel et au relais 3x1000m. Athlète de l'année de la ville de Strasbourg, catégorie: sport universitaire.
2009-2010	Finaliste aux championnats de France Elite en salle sur 800m
2013-2014	16 courses sur route, 11 victoires 1ère place à La Strasbourgeoise (10 000 marcheuses et coureuses) Championne départementale et régionale Cross Country (court) Championne régionale 3000m en salle Championne régionale 800m outdoor 4ème aux Championnats de France nationaux 800m Records personnels: 800m en 2'12'21''- 3000m salle en 10'31''-5km

route en 18'16''

AUTRES DIPLOMES

2009	Formation PSC 1, Prévention Secours Civiques de niveau 1
2008	Certificat informatique et internet Niveau 1 (C2i)
2008	Moniteur régional en athlétisme
2007	Animateur régional en athlétisme

LANGUES

Allemand :	Langue maternelle
Français :	Langue maternelle
Anglais :	Écrit, parlé, couramment

LISTE DES PUBLICATIONS FAISANT L'OBJET DE CETTE THESE

1. **Schlagowski A-I**, Singh F, Charles A-L, Favret F, Piquard F, Geny B, Zoll J. *Mitochondrial uncoupling reduces exercise capacity despite several skeletal muscle metabolic adaptations*. J Appl Physiol (1985). 2014 Feb 15;116(4):364-75
2. **Schlagowski A-I**, Dufour S, Rasseneur L, Enache I, Lonsdorfer-Wolf E, Doutreleau S, Isner-Horobeti M-E, Charloux A, Charles A-L, Vogel T, Speich J-P, Geny B, Zoll J and Favret F. *Study of muscular mitochondrial respiration and blood ROS production after acute uphill and downhill exercises: role of mechanical and metabolic stimuli*. soumis.
3. **Schlagowski AI**, Singh F, Charles AL, Isner-Horobeti ME, Favret F, Pisteu C, Piquard F, Geny B, Zoll J. *Acute exercise preconditioning induced mitochondrial protection against skeletal muscle ischemia-reperfusion injury*. En cours de préparation.

LISTE DES PUBLICATIONS NE FAISANT PAS L'OBJET DE CETTE THESE

1. Eschbach J, Sinniger J, Boutbir J, Fergani A, **Schlagowski A-I**, Zoll J, Geny B, René F, Larlet Y, Marion V, Robert H, Harms M, Dupuis L. *Dynein mutations associated with hereditary motor neuropathies impair mitochondrial morphology and function with age*. Neurobiol Dis. 2013 Oct; 58:220-30.
2. Meyer A, Charles A-L, Zoll J, Guillot M, Lejay A, Singh F, **Schlagowski A-I**, Isner-Horobeti M-E, Pisteu C, Charloux A, Geny B. *Cryopreservation with dimethyl sulfoxide prevents accurate analysis of skinned skeletal muscle fibers mitochondrial respiration*. Int J Biochem Cell Biol. 2014 May;50:101-5.
3. Lejay A, Meyer A, **Schlagowski AI**, Charles AL, Singh F, Bouitbir J, Pottecher J, Chakfé N, Zoll J, Geny B. *Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle*. Int J Biochem Cell Biol. 2014 May;50:101-5.

4. Wolff V, **Schlagowski A-I**, Rouyer O, Charles A-L, Singh F, Auger C, Schini-Kerth V, Marescaux C, Raul J-S, Zoll J, Geny B. *Tetrahydrocannabinol (THC) induces brain mitochondrial respiratory chain dysfunction and increases oxidative stress*; soumis BioMed Research International.
5. Singh F, Charles AL, **Schlagowski A-I**, Bouitbir J, Bonifacio A, Piquard F, Krähenbühl S, Geny B, Zoll J. *N-Acetylcysteine protects myoblast mitochondrial function against statin-induced apoptosis by triggering mitohormesis*; en révision. BBA Molecular Cell research.
6. Bouitbir J, Singh F, Charles AL, **Schlagowski AI**, Bonifacio A, Echaniz-Laguna A, Krähenbühl S, Geny B, Zoll J. *Statin Treatment induces apoptosis by increasing mitochondrial reactive oxygen species in skeletal muscles*. Soumis. CardioVascular Research.
7. Diana M, Pop R, Halvax P, **Schlagowski A-I**, Bour G, Liu YY, Diemunsch P, Geny B, Dallemagne B, Beaujeux R, Lindner V, Demartines, Marescaux J. *Embolization of Arterial Gastric supply before Obesity surgery (EMBARGO): modulation of hormonal response and ischemic conditioning of the gastric tube. Proof of the concept in the porcine model*. soumis Gastroenterology.

COMMUNICATIONS ORALES

1. Congrès MiToStrass, Strasbourg (18 décembre 2012) :

- Présentation (anglais) « Efficiency of skeletal muscle mitochondrial coupling is a critical factor for maximal exercise capacity and oxygen uptake in rats » (*Schlagowski A-I, Singh F, Charles A-L, Piquard F, Geny B, Zoll J*).

2. 8ème Congrès de Physiologie de Pharmacologie et de Therapeutique, Angers (22-24 avril 2013)

- Efficiency of skeletal muscle mitochondrial coupling is a critical factor for maximal exercise capacity and oxygen uptake in rats » (*Schlagowski A-I, Singh F, Charles A-L, Piquard F, Geny B, Zoll J*).

3. European College of Sport Science, Barcelona, SPAIN, 26-29 juin 2013 :

- Efficiency of skeletal muscle mitochondrial coupling is a critical factor for maximal exercise capacity and oxygen uptake in rats » (*Schlagowski A-I, Singh F, Charles A-L, Piquard F, Geny B, Zoll J*).

4. Printemps de la Cardiologie, Srasbourg (23-25 avril 2014) :

- Acute exercise preconditioning induced mitochondrial protection against skeletal muscle ischemia-reperfusion injury (*Schlagowski AI, Singh F, Charles AL, Favret F, Piquard F, Geny B, Zoll J*).

COMMUNICATIONS POSTERS

1. Congrès MiToStrass, Strasbourg (18 décembre 2012) :

- Effects of concentric vs eccentric exercise during incremental and rectangular exercise in rats: changes in reactive oxygen species and mitochondria respiration rate (*Schlagowski A-I, Dufour S, Rasseneur L, Enache I, Lonsdorfer-Wolf E, Doutreleau S, Isner-Horobeti M-E, Charloux A, Charles A-L, Speich J-P, Geny B, Zoll J and Favret F.*)
- N-acetylcystein triggers a mitochondrial hormesis mechanism improving cellular antioxidant capacities (*Singh F, Charles A-L, Schlagowski A-I, Fumagalli D, Piquard F., Geny B, Zoll J.*).
- Increased production of free radicals: new pathogenic role for mitochondria in inflammatory myopathies ? (*Meyer A, Hengen M, Charles A-L, Zoll J, Singh F, Schlagowski A I, Echaniz A, Sibilis J, Gottenberg J E, Geny B.*)
- The transcriptional co-regulator *TIF2* regulates energy homeostasis by modulating mitochondrial respiration in skeletal muscle myofibers. (*Ramamoorthy T, Schlagowski A I, Duteil D, Chambon C, Malivindi R, Zoll J, Geny B, Chambon P, Metzger D*).
- Matrix Metalloprotease-11/stromelysin-3, a master regulator of energy homeostasis and mitochondria function (*Dali-Youcef N, Mecili M, Schlagowski A I, Zoll J, Ricci R, Andrès E*).
- Critical limb ischemia: from human disease to the development and validation of an experimental mice model (*Lejay A, Thaveau F, Georg Y, Charles A L, Schlagowski A I, Singh F, Bajcz C, Zoll J, Geny B, Kretz J G.*)

2. 8^{ème} Congrès de Physiologie de Pharmacologie et de Therapeutique, Angers (22 au 24 avril 2013)

- N-acetylcystein triggers a mitochondrial hormesis mechanism improving cellular antioxidant capacities (*Singh F, Charles A-L, **Schlagowski A-I**, Fumagalli D, Piquard F., Geny B,; Zoll J.*).

3. Printemps de la Cardiologie, Marseille (18-19 avril 2013) :

- Statins treatment induces apoptosis In Vivo by increasing mitochondrial ROS in skeletal muscles (*Singh F, Bouitbir J, Charles A L, **Schlagowski A I**, Eschaniz-Laguna A, Piquard F, Geny B, Zoll J.*).

4. 25^{ème} congrès français du rhumatisme 2012 :

- Increased production of free radicals: new pathogenic role for mitochondria in inflammatory myopathies ? (*Meyer A, Hengen M, Charles A-L, Zoll J, **Schlagowski A I**, Singh F, Echaniz A, Sibilia J, Gottenberg J E, Geny B.*).

5. Printemps de la Cardiologie, Srasbourg (23-25 avril 2014) :

- N-Acetylcysteine protects myoblast mitochondrial function against statin-induced apoptosis by triggering mitohormesis. (*Singh F, Charles AL, **Schlagowski A-I**, Bouitbir J, Bonifacio A, Piquard F, Krähenbühl S, Geny B, Zoll J.*).

ABRÉVIATIONS

$\Delta\psi$	potentiel de membrane
AA	antimycine A
Ach	acétycholine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine-5'-diphosphate
ANT	transporteur des nucléotides adényliques
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine-5'-triphosphate
ATPase F0-F1	ATP synthase
BSA	albumine de sérum bovin
Ca²⁺	ion calcium
CO₂	dioxyde de carbone
CONC	concentrique
CK	créatine kinase
Cox	cytochrome c oxydase
CRC	complexe de relachement du calcium
Cr	créatine
CS	citrate synthase
Cu/Zn-SOD	superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc
CYP	enzyme cytochrome P450
Cyt C	cytochrome c
DHPR	récepteurs des dihydropyridines
DNP	2,4-dinitrophénol
EXC	excentrique
FC	fréquence cardiaque
FADH₂/FAD⁺	flavine adénine dinucléotide réduite/oxydée
Glut-1	glucose transporter 1
Glut-2	glucose transporter 2
Glut-4	glucose transporter 4
GPx	glutathion peroxydase

GR	glutathion reductase
GSH/GSSG	glutathion réduit/oxydé
HDL-C	high density lipoprotein-cholesterol
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
H⁺	ions hydrogène
[Hb]	concentration sanguine en hémoglobine
HIF1	hypoxia inductible factor 1
HCO₃⁻	ions bicarbonate
LDL-C	low density lipoprotein-cholesterol
mi-CK	créatine kinase mitochondriale
Mn-SOD	superoxyde dismutase associée au manganèse
mPTP	Pore de transition de perméabilité mitochondrial
mtADN	ADN mitochondrial
NADH, H⁺/NAD⁺	nicotinamide adénine dinucléotide réduit/oxydé
NADPH, H⁺/NADP⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit/oxydé
O₂	dioxygène
O₂^{•-}	anion superoxyde
OH⁻	ion hydroxyde
OH[•]	radical hydroxyle
Q	quinone
PCR	polymerase chain reaction
PGC-1α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator alpha
PGC-1β	peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator beta
Pi	phosphate inorganique
mPTP	pore de transition de perméabilité
NRF	nuclear respiratory factor
O₂	oxygène
PO₂	pression partielle en oxygène
Q	débit cardiaque
Q_{musc}	débit musculaire
ROS/RLO	Reactive Oxygen Species ou radicaux libres oxygénés
rRNA	ARN ribosomique

RyR	récepteur à la ryanodine
SaO₂	saturation sanguine en oxygène
SIRT1	sirtuin 1
SERCA	Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SOD1	superoxyde dismutase 1
SOD2	superoxyde dismutase 2
TFAm	mitochondrial transcription factor A
Tlim	temps d'épuisement lors d'un effort à vitesse ou puissance mécanique externe constante
TMPD	N, N, N', N' tétraméthyl-1,4-phenylènediamine
TnC	troponine C
TnI	troponine I
TnT	troponine T
tRNA	ARN de transfert
Ub	ubiquinone
UbH•	ubisemiquinone
UbH₂	ubiquinol
UCP	protéine découplante (UnCoupling Protein)
V_E	ventilation
VEGF	vascular endothelial growth factor
VES	volume d'éjection systolique
VO₂	débit de consommation d'oxygène
VCO₂	débit de rejet de dioxyde de carbone
V_{max}	respiration mitochondriale maximale mesurée sur fibres perméabilisées in situ
VDAC	Voltage dependant anion channel

LISTE DES FIGURES

Fig 1 :	Organisation du muscle squelettique	p.11
Fig 2 :	La structure du muscle squelettique: du muscle à l'unité contractile	p.12
Fig 3 :	Structure des filaments contractiles	p.14
Fig 4 :	Schéma du réticulum sarcoplasmique	p.16
Fig 5 :	Schéma de la contraction musculaire	p.17
Fig 6 :	Marquage au NADH sur une coupe transversale d'un muscle squelettique	p.19
Fig 7:	Section longitudinale des fibres rapides, intermédiaires et lentes d'un muscle triceps brachial d'une femme âgée de 25 ans	p.20
Fig 8 :	Schéma du métabolisme des substrats énergétiques	p.27
Fig 9 :	Structure d'une mitochondrie	p.31
Fig 10 :	Chaîne de transport des électrons	p.35
Fig 11 :	Schéma du couplage/découplage de la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie	p.43
Fig 12:	Schéma du découplage de la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie	p.46
Fig 13 :	Sites de production de RLO au niveau de la chaîne respiratoire	p.54
Fig 14:	Localisation des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans la cellule musculaire	p.59
Fig 15:	Schéma illustrant l'action des statines sur la fonction mitochondriale selon le phénotype musculaire	p.63
Fig 16 :	L'influence de la production de RLO sur la mitochondrie: the good, the bad and the ugly	p.64
Fig 17 :	Les différentes étapes de la consommation d'oxygène	p.73
Fig 18 :	Régulation de PGC-1 α	p.81
Fig 19 :	Biogenèse mitochondriale induite par l'activité physique au niveau du muscle squelettique	p.84
Fig 20 :	Contractions musculaires en excentrique et concentrique	p.91
Fig 21 :	Coupe histologique d'un muscle squelettique humain en ischémie	p.94

Fig 22 :	Séquence des événements survenant pendant l'ischémie reperfusion	p.95
Fig 23 :	Schéma du modèle de mesure de la consommation d'oxygène avec masque chez le rat	p.107
Fig 24:	Comparaison de modèles de mesure de consommation d'O ₂ classiques versus le modèle avec masque	p.107
Fig 25:	Protocole d'études des adaptations mitochondriales suite à un stress métabolique versus mécanique	p.110
Fig 26 :	Schéma du protocole d'étude du découplage mitochondrial	p.113
Fig 27 :	Protocole d'étude de l'effet protecteur d'un exercice aigu avant une période d'ischémie reperfusion sur la fonction mitochondriale	p.116
Tableau 1 :	Caractéristiques des fibres de type I et de type II des muscles squelettiques et leurs principales sources d'énergie	p.21

Sommaire

PREAMBULE	6
ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES	9
1. LES MUSCLES SQUELETTIQUES : CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES	10
<i>1.1. Propriétés et fonction du muscle squelettique</i>	<i>10</i>
1.1.1. Organisation du muscle strié	10
1.1.2. L'appareil contractile des muscles striés	11
1.1.3. Organisation et fonctionnement du sarcomère	13
1.1.3.1. Les filaments fins	13
1.1.3.2. Les filaments épais	13
1.1.3.3. Les autres types de filaments musculaires.....	14
1.1.4. Le réticulum sarcoplasmique (RS) et les mouvements de calcium	15
1.1.5. Mouvement calcique et couplage Excitation-Contraction	16
1.1.6. Classification des fibres musculaires striées squelettiques	18
1.1.6.1. Les fibres à contraction lente.....	19
1.1.6.2. Les fibres à contraction rapide	20
1.1.6.3. Les fibres intermédiaires	21
1.1.6.4. Les différents phénotypes métaboliques	22
<i>1.2. Caractéristiques métaboliques et voies de synthèse de l'ATP</i>	<i>23</i>
1.2.1. Les transferts d'énergie au sein de la fibre musculaire	23
1.2.1.1. Le système ATP-PCr (filière anaérobie alactique)	24
1.2.1.2. La voie anaérobie	24
1.2.1.3. La voie aérobie	26
1.2.1.4. Les différents substrats énergétiques mitochondriaux	27
1.2.1.5. Les mitochondries	29
1.2.1.6. La respiration mitochondriale.....	33
1.2.1.7. La chaîne de transport des électrons et phosphorylation oxydative	34
1.2.1.8. La phosphorylation oxydative (PHOSPHOX).....	37
1.2.2. Notion de couplage et de découplage mitochondrial	42
1.2.2.1. Le découplage mitochondrial	43
1.2.2.2. Les protéines découplantes	44
1.2.2.3. Les découplants pharmacologiques (DNP, CCCP et FCCP).....	45
2. LE STRESS OXYDANT	47
<i>2.1. Différentes formes de radicaux libres et dégâts cellulaires</i>	<i>48</i>

2.2.	<i>Le découplage mitochondriale et la production de RLO</i>	49
2.3.	<i>Sources cellulaires des RLO</i>	51
2.3.1.	La xanthine oxydase	51
2.3.2.	La NADPH oxydase	51
2.3.3.	Le réticulum endoplasmique	51
2.3.4.	Les peroxysomes	52
2.3.5.	La mitochondrie	52
2.4.	<i>Système de défense antioxydant</i>	55
2.4.1.	Systèmes antioxydants enzymatiques	56
2.4.2.	Systèmes antioxydants non enzymatiques	57
2.4.3.	Supplémentation en antioxydants	59
2.4.4.	Carences en anti-oydants	60
2.5.	<i>Dégats cellulaires</i>	60
2.5.1.	Peroxydation lipidique	60
2.5.2.	Domage de l'ADN	61
2.6.	<i>Le concept de l'hormèse mitochondriale ou mitohormesis</i>	62
3.	LES DETERMINANTS DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE MAXIMALE	65
3.1.	<i>Les facteurs limitant la consommation maximale d'Oxygène (VO₂max)</i>	67
3.1.1.	Les facteurs centraux	67
3.1.1.1.	Le système pulmonaire	67
3.1.1.2.	Le Débit cardiaque maximal (Q _{max}).....	68
3.1.1.3.	Le transport d'oxygène.....	69
3.1.2.	Les facteurs périphériques	70
3.1.2.1.	L'aspect structural: densité capillaire	70
3.1.2.2.	Le gradient de diffusion de l'oxygène	70
3.1.2.3.	L'aspect fonctionnel: capacités oxydatives musculaires.....	70
3.2.	<i>Limitation centrale ou périphérique ?</i>	71
4.	MODIFICATION DU PHENOTYPE MUSCULAIRE ET EFFET SUR LES ADAPTATIONS MITOCHONDRIALES APRES UN ENTRAINEMENT EN ENDURANCE	74
4.1.	<i>Les effets sur le phénotype contractile</i>	74
4.2.	<i>Les effets sur le phénotype métabolique</i>	75
4.2.1.	L'amélioration de l'extraction d' O₂	78
4.2.2.	L'amélioration du débit sanguin musculaire	78
4.2.3.	L'adaptation du réseau capillaire	79
4.3.	<i>Les effets sur le contrôle transcriptionnel de la biogenèse mitochondriale</i>	80
4.3.1.	L' expression génique	80
4.3.2.	Le facteur PGC-1alpha	81

4.3.3.	Le facteur de transcription Tfam	83
4.3.4.	L'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire	83
4.4.	<i>L'augmentation du métabolisme et la production de radicaux libres</i>	85
4.5.	<i>Les effets d'un exercice en descente et en montée sur les adaptations mitochondriales musculaires: un Intérêt thérapeutique</i>	87
4.5.1.	Introduction.....	87
4.5.2.	L'exercice en montée	88
4.5.3.	L'exercice en descente.....	89
5.	PRÉCONDITIONNEMENT PAR L'EXERCICE PHYSIQUE DANS L'ISCHEMIE-REPERFUSION	92
5.1.	<i>L'ischémie-reperfusion du muscle squelettique</i>	92
5.2.	<i>Lésions d'ischémie-reperfusion</i>	93
5.3.	<i>Protection mitochondriale</i>	96
5.3.1.	Découverte du concept de préconditionnement ischémique dans le muscle squelettique....	96
5.3.2.	Mécanismes protecteurs du préconditionnement.....	97
5.3.3.	Effet protecteur de l'exercice aigue.....	98
	OBJECTIFS SCIENTIFIQUES	100
	MATERIELS ET METHODES	105
1.	PROTOCOLES IN VIVO DES TROIS ETUDES PRINCIPALES	106
1.1.	<i>Développement ou importation de nouvelles techniques au sein du laboratoire</i>	106
1.1.1.	Développement du modèle de mesure de la consommation d'oxygène avec masque chez le rat	106
1.1.2.	Technique de mesure de la consommation d'oxygène chez le rat	108
1.1.2.1.	Mesure de la consommation d'oxygène chez le rat au repos.....	108
1.1.2.2.	Mesure de la consommation d'oxygène chez le rat au cours du test triangulaire.....	108
1.1.3.	Protocole de l'étude des adaptations mitochondriale suite à un stress métabolique versus mécanique par un exercice en descente versus montée	109
1.1.3.1.	Les animaux.....	109
1.1.3.2.	Le test triangulaire maximale	109
1.1.3.3.	Le test rectangulaire sous-maximale.....	110
1.1.3.4.	Le sacrifice et le prélèvement musculaire.....	110
1.1.4.	Protocole de l'étude du découplage mitochondrial (à l'aide du DNP)	111
1.1.4.1	Description des modèles cellulaires.....	111
1.1.4.2.	Les animaux.....	111
1.1.4.3.	Protocole d'étude.....	112
1.1.4.4.	Le test triangulaire maximal	112
1.1.4.5.	Le sacrifice et prélèvement musculaire.....	113

1.1.5. Etude de l'effet protecteur d'un exercice aigu sur la fonction mitochondriale suite à une période d'ischémie reperfusion du muscle squelettique	113
1.1.5.1. Le protocole d'exercice	114
1.1.5.2. Le protocole d'ischémie-reperfusion (I-R).....	114
1.1.6. Technique chirurgicale d'ischémie unilatérale d'un membre inférieur par application d'un garrot à la racine du membre	114
1.1.7. Prélèvements musculaires.....	115
2. PROTOCOLES IN VITRO DES TROIS ETUDES PRINCIPALES	116
2.1. <i>Protocole d'étude de la respiration mitochondriale</i>	116
2.1.1. Solutions	116
2.1.2. Perméabilisation et rinçage des fibres.....	117
2.1.3. Protocole d'étude de la chaîne de respiration mitochondriale	117
2.2. <i>Protocole de détection de l'anion superoxyde par résonance paramagnétique électronique</i> ..	118
2.2.1. Solutions.....	118
2.2.2. Préparation des fibres.....	118
2.2.3. Protocole d'étude de la production de l'anion superoxyde.....	119
2.3. <i>Protocole de mesure de la production d'H2O2 mitochondriale</i>	120
2.3.1. Solution	120
2.3.2. Préparation des fibres.....	120
2.3.3. Protocole d'étude de la production d'H2O2 mitochondriale	120
2.4. <i>Evaluation du niveau d'expression des ARNm par q-RT-PCR</i>	121
2.4.1. Extraction de l'ARN	121
2.4.2. Synthèse de l'ADNc par transcription réverse (RT)	122
2.4.3. Amplification de l'ADNc par PCR quantitative en temps réel	122
3. STATISTIQUES.....	122
RESULTATS	123
CHAPITRE 1. ETUDE DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE ET DU STRESS OXYDANT APRES UNE COURSE EN DESCENTE ET EN MONTÉE: RÔLE DU STIMULUS MÉCANIQUE ET METABOLIQUE	124
1.1. Présentation	124
1.2. L'objet de notre étude.....	126
1.3. Résultats.....	126
1.4. Principaux résultats.....	127
1.5. Conclusion	128
CHAPITRE 2. LE DECOUPLAGE MITOCHONDRIALE DIMINU LES CAPACITÉS À L'EXERCICE, MALGRÉ DES ADAPTATIONS MÉTABOLIQUES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE.....	130
2.1. Présentation	130

2.2.	L'objet de notre étude.....	131
2.3.	Résultats.....	131
2.4.	Principaux résultats.....	132
2.5.	Conclusion	132
CHAPITRE 3. EFFET PROTECTEUR DE L'EXERCICE PHYSIQUE SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE DU MUSCLE SQUELETTIQUE APRÈS ISCHÉMIE-REPERFUSION.		
3.1.	Présentation	134
3.2.	L'objet de notre étude.....	135
3.3.	Résultats.....	135
3.4.	Principaux résultats.....	136
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES		
I. 1^{ère} étude: L'exercice en descente permet de maintenir une puissance mécanique importante avec une moindre demande métabolique et sans altérer la fonction mitochondriale du muscle squelettique		
1.	L'évolution des paramètres physiologiques après un entraînement en excentrique	138
2.	Stress cardiovasculaire et métabolique	139
3.	Les conséquences et les impacts délétères induits par l'entraînement excentrique	141
4.	Intérêt de l'exercice excentrique dans le cadre des pathologies chroniques	142
5.	La prévention des affections cardio-vasculaires.....	143
II. 2^{ème} étude: Le découplage mitochondrial diminue les capacités à l'exercice, malgré des adaptations métaboliques dans le muscle squelettique.....		
1.	Le coût énergétique.....	146
2.	Les valeurs de VO ₂ max, véritable prédicteur de la performance ?	147
III. 3^{ème} étude: L'effet protecteur d'un exercice aigu avant une période d'ischémie-reperfusion sur la fonction mitochondriale du muscle squelettique.		
1.	Préconditionnement de l'IR par un découplage modéré.....	152
2.	Préconditionnement par un exercice en excentrique?	154
CONCLUSION GENERALE		
BIBLIOGRAPHIE.....		

PREAMBULE

PREAMBULE

Le muscle squelettique est un élément essentiel dans l'ensemble des structures qui assurent le mouvement et la locomotion. Il se caractérise par sa complexité et par l'importante diversité de ses éléments constitutifs. Cette diversité a pour but d'assurer la spécialisation d'un type de muscle dans un rôle fonctionnel bien précis et traduit aussi sa « plasticité » et ses propriétés d'adaptation aux différents facteurs de son environnement immédiat. C'est également un tissu susceptible de présenter des signes de désadaptation et de déconditionnement en réponse à certaines pathologies telle l'insuffisance cardiaque. Depuis très longtemps il est connu que l'exercice physique est bénéfique pour la santé et permet notamment d'améliorer les capacités à l'exercice de patients, en améliorant à la fois les composantes centrales (débit cardiaque, vasomotricité) et périphériques (extraction de l'oxygène et métabolisme musculaire). Au niveau du muscle squelettique, il a été décrit des effets bénéfiques à la fois au niveau du phénotype contractile (typage musculaire, hypertrophie des fibres) et métaboliques (augmentation du nombre de mitochondrie, amélioration des capacités anti-oxydantes).

La connaissance des mécanismes impliqués dans les adaptations du phénotype métabolique musculaire ne cesse de grandir mais reste imparfaitement connus. De plus en plus de scientifiques se rendent compte de l'importance des variations de l'homéostasie cellulaire, provoquant d'importants changements au niveau de la fonction mitochondriale. Inversement, il est clair que la mitochondrie participe aux variations de cette homéostasie et influence le devenir et les adaptations de l'ensemble de la cellule. Un véritable dialogue bilatéral entre la cellule et la mitochondrie semble dicter à la fois les adaptations cellulaires et mitochondriales. Dans ce cadre, plusieurs paramètres jouent des rôles importants:

Premièrement, le niveau de production de radicaux libres de l'oxygène (RLO). En effet la mitochondrie est à la fois sensible à ce stress et est un producteur majeur de ces RLOs. Ainsi, dans les dernières années a émergé le concept suivant lequel les RLOs ne sont pas seulement délétères pour la mitochondrie et la cellule, mais lorsqu'ils sont produits en quantités relativement faibles, permettent l'activation d'un certain nombre de voies de signalisation menant à des adaptations cellulaires et plus particulièrement au niveau de la mitochondrie.

Deuxièmement, la capacité mitochondriale à produire de l'ATP, à maintenir un niveau élevé d'ATP est très important et va participer aux adaptations métaboliques musculaires par l'intermédiaire de l'activation ou non de certaines protéines impliquées dans

les voies de contrôle du métabolisme musculaire, que ce soit en situation aigu ou chronique. Ainsi, il est clairement important d'essayer de mieux comprendre comment la mitochondrie va être capable de s'adapter à différentes situations physiologiques ou physiopathologiques. De plus, le rôle joué par la fonction mitochondriale du muscle squelettique dans la détermination de la capacité maximale de consommation de l'oxygène ainsi que dans la performance en endurance reste largement débattu. C'est pourquoi nous nous y sommes intéressés par l'intermédiaire d'un modèle animal dans lequel le fonctionnement du couplage mitochondrial est altéré.

Concernant le plan de ma thèse, nous avons tout d'abord exposé, dans les deux premiers chapitres de l'introduction, les propriétés des muscles squelettiques qui permettent l'établissement du phénotype musculaire, avec en particulier, l'établissement du phénotype contractile et métabolique. Nous avons tout particulièrement développé la partie concernant les caractéristiques du phénotype métabolique et les voies de synthèse de l'ATP, en mettant en évidence le rôle important de la mitochondrie. Nous avons ensuite exposé une revue de la littérature concernant le stress oxydant et ses effets à la fois délétères et bénéfiques sur l'adaptation mitochondriale. Dans un 3^{ème} chapitre, nous avons exposés les déterminants de la consommation d'oxygène maximale (VO₂max), en terminant avec un débat sur les limitations plutôt centrales ou périphériques. Un 4^{ème} chapitre présentera les modifications du phénotype musculaire induites par l'entraînement en endurance puis dans un dernier chapitre nous finirons par la présentation d'un modèle de préconditionnement par l'exercice physique dans l'ischémie-reperfusion.

Puis suivent les parties matériels et méthodes, résultats et pour finir la discussion générale et les perspectives.

ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

1. LES MUSCLES SQUELETTIQUES : CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES

Alors que les plantes vertes tirent leur énergie à partir de la lumière du soleil et les nutriments à partir du sol, les animaux doivent aller chercher leur nourriture ou chasser leurs proies, mettant en œuvre de nombreux muscles impliqués dans la locomotion et la préhension. C'est là une des différences majeures entre animaux et végétaux. Le principal propos de ce chapitre est d'expliquer le lien entre les mécanismes moléculaires et la fonction du muscle entier travaillant dans l'organisme.

Nous allons d'abord décrire les protéines contractiles et rapidement expliquer leur disposition en sarcomères et myofibrilles à l'intérieur des fibres musculaires, puis la façon dont ces fibres sont intégrées avec le tissu conjonctif pour former le muscle entier.

1.1. Propriétés et fonction du muscle squelettique

Les muscles forment l'ensemble de tissus le plus important de l'organisme. Ils représentent environ la moitié du poids du corps. Les muscles squelettiques, à eux seuls, forment environ 40% du poids du corps chez l'homme et 32% chez la femme. Chez les vertébrés, le rôle principal des muscles squelettiques est de permettre le déplacement dans l'espace. Ils montrent des particularités fonctionnelles importantes, notamment au niveau des vitesses de contraction, de la force développée et de la résistance à la fatigue. De plus, ils présentent une plasticité élevée en réponse aux contraintes environnementales, basée sur le potentiel de la fibre musculaire à subir des changements dans sa cytoarchitecture et dans sa composition en isoformes de protéines musculaires.

1.1.1. Organisation du muscle strié

Le muscle squelettique est formé d'un ensemble de faisceaux de fibres musculaires, les cellules du muscle squelettique, qui s'étendent d'une extrémité à l'autre du muscle sont plus ou moins longues, de forme allongée et cylindrique, placées en parallèle. Chaque fibre musculaire est revêtue d'une fine gaine de tissu conjonctif, l'endomysium (voir figure 1). Elles sont rassemblées en plusieurs faisceaux enrobés par une gaine plus épaisse de tissu conjonctif: le périmysium. L'ensemble du muscle est renforcé et recouvert par une gaine de tissu conjonctif, l'épimysium.

Possédant une structure très organisée, les éléments de base des fibres du muscle sont les myofilaments (ou myofibrille) dont l'unité morphologique et fonctionnelle est le sarcomère. Celui-ci est lui-même constitué d'un assemblage de filaments fin et épais, qui sont associés à des protéines de structure et de régulation.

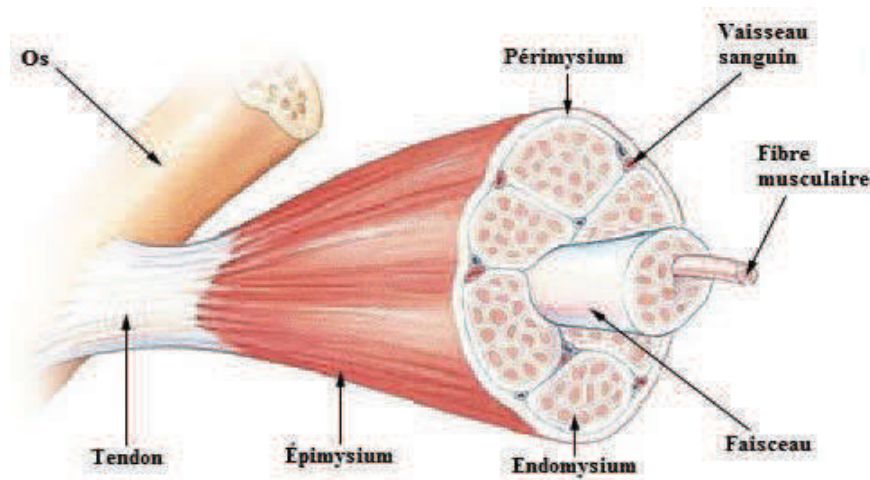


Figure 1. Organisation du muscle squelettique. Schéma adapté de Marieb EN. *Anatomie et physiologie humaines*, 6^{ème} édition 2005. Chaque fibre musculaire est revêtue d'une fine gaine de tissu conjonctif, l'endomysium. Les faisceaux de fibres musculaires sont délimités par une gaine plus épaisse de tissu conjonctif, le périmysium. L'ensemble du muscle est renforcé et recouvert par une gaine de tissu conjonctif, l'épimysium.

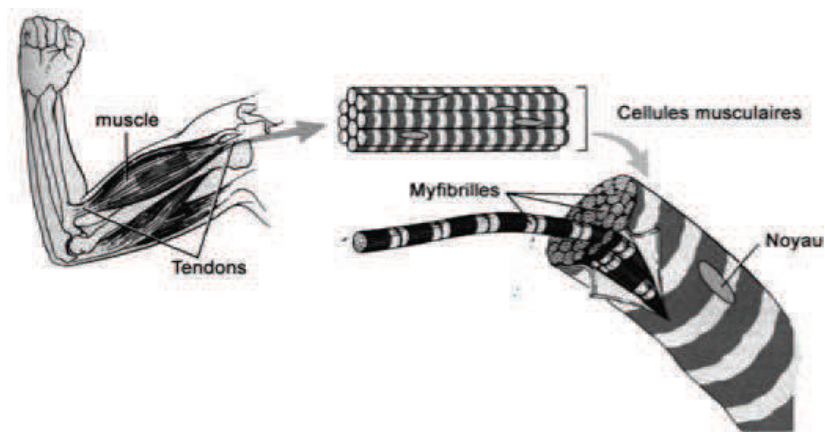
1.1.2. L'appareil contractile des muscles striés

L'appareil contractile du muscle squelettique est constitué par les myofilaments. Le sarcomère, unité morphologique et fonctionnelle des myofilaments, est composé par l'assemblage des protéines contractiles, l'actine et la myosine, auxquelles sont associées d'autres protéines myofibrillaires (voir figure 2a). L'interconnexion entre les sarcomères se fait au niveau des lignes Z situées au milieu des filaments d'actine et comprennent l'actinine et des filaments de nébuline (voir figure 2b). La zone centrale du sarcomère, la bande A, est composée par l'enchevêtrement des filaments d'actine et de myosine. La bande A est traversée en son milieu par la bande M au niveau de laquelle sont notamment associées la protéine M et la créatine kinase sarcomérique, qui assurent un rôle structural permettant l'assemblage des filaments de myosine entre eux. Cette bande est délimitée de part et d'autre par la bande I qui constitue le prolongement des filaments fins. Des protéines régulatrices : la troponine et la tropomyosine sont associées aux filaments d'actine. La contraction musculaire

résulte du glissement des filaments d'actine par rapport à ceux de myosine de sorte que les lignes Z se rapprochent les unes les autres.

Les protéines contractiles, l'actine (filament fin) et la myosine (filament épais) sont maintenues en place par diverses protéines de structure dont la titine sur laquelle se condense la myosine, la desmine qui lie la ligne Z aux myofibrilles adjacentes, la nébuline, qui renforce le filament fin, et la dystrophine qui ancre l'appareil contractile à la membrane de surface.

A)



B)

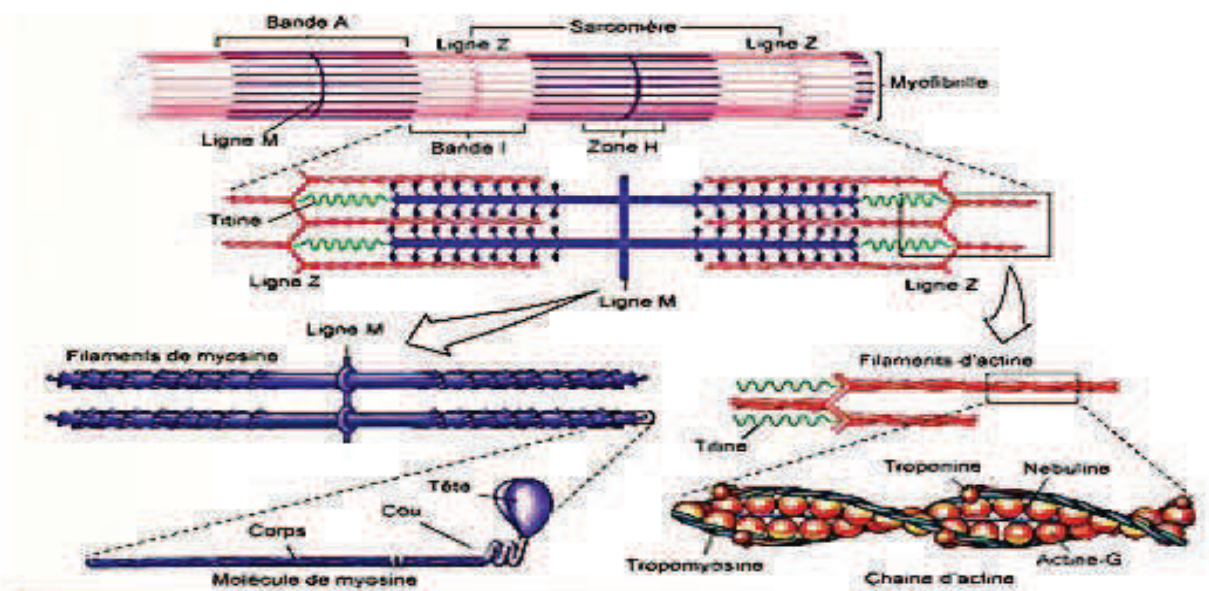


Figure 2. La structure du muscle squelettique: du muscle à l'unité contractile. A) La fonction de contraction du muscle est réalisée par les myofibrilles, l'appareil contractile des cellules musculaires,

composées d'une succession de sarcomères. (*Adaptation de (Goll et al., 2008)*). B) Sarcomères d'une myofibrille de muscle squelettique en coupe longitudinale. Les filaments épais de la bande A sont constitués de myosine, les filaments fins de la bande I, d'actine.

1.1.3. Organisation et fonctionnement du sarcomère

1.1.3.1. Les filaments fins

L'actine avec la tropomyosine et le complexe de troponines sont les principaux composants des filaments fins.

L'actine: L'actine retrouvée dans le muscle lent est identique à celle identifiée dans les muscles rapides (Schiaffino & Reggiani, 1996). Les filaments minces de l'actine comprennent plusieurs protéines de régulation dont la tropomyosine.

La tropomyosine (TM): Le filament de TM est une protéine fibreuse avec une structure en hélice qui se trouve insérée dans le filament d'actine pour la rigidifier. La TM assure d'une part une rigidité structurale au filament fin, et d'autre part participe au contrôle de la disponibilité du site de liaison de l'actine avec la myosine via son association avec le complexe des troponines.

Les troponines (Tn): La Tn présente trois unités distinctes, la TnT, la TnI et la TnC. La TnT lie la tropomyosine au complexe des Tn. La TnC contient le site de fixation du calcium et contrôle la contraction musculaire. La TnI inhibe les interactions actine-myosine. Il est montré que la variété des isoformes TnT peut expliquer les différences de sensibilité des myofilaments pour le calcium, celles d'activation de la myosine ATPase et aussi celles de coopération de l'activation calcique, au sein des différents types musculaires (pour revue voir ((Gordon *et al.*, 2000)).

1.1.3.2. Les filaments épais

La myosine: La molécule de myosine est à la fois une protéine de structure et une protéine fonctionnelle (enzyme). Elle possède une structure très particulière : semblable à un bâton de golf, sa tige cylindrique se termine à l'une de ses extrémités par une tête sphérique comportant elle-même deux lobes. Les deux lobes de la tête sont les extrémités de ces chaînes lourdes et les « sites actifs » de la myosine. La tête lie ensemble les myofilaments épais et les myofilaments minces durant la contraction, formant ainsi des ponts d'union. Ainsi, Ces

derniers sont les moteurs qui produisent la tension exercée lors de la contraction de la cellule musculaire.

Chaque filament épais compte environ 200 molécules de myosine qui sont bipolaires, c'est à dire qu'elles sont regroupées de telle sorte que leurs tiges constituent la partie centrale du filament et que leurs têtes se dressent à chaque extrémité dans des directions opposées (voir figure 3). Par conséquent, la partie centrale du filament épais est lisse, mais ses extrémités sont garnies de têtes de myosines disposées de façon hélicoïdale autour de son axe. En plus de comporter des sites de liaison de l'actine, les têtes contiennent des sites de liaison de l'ATP, ainsi que des enzymes ATPases qui dissocient l'ATP en ADP + Pi, afin de produire l'énergie nécessaire à la contraction musculaire.

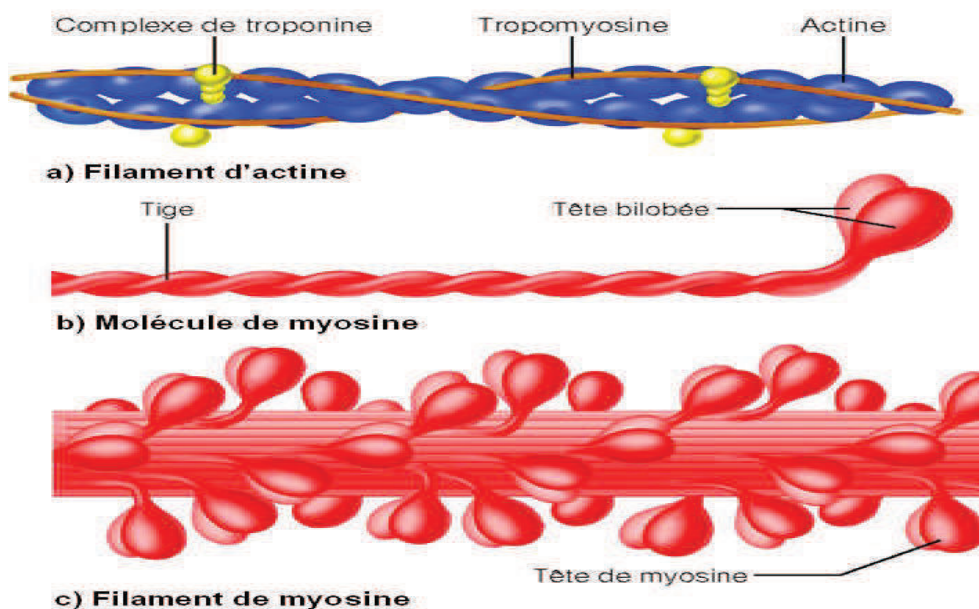


Figure 3. Structure des filaments contractiles. Adapté par Marieb et Hoehn. 2010

1.1.3.3. Les autres types de filaments musculaires

Au cours de la dernière décennie, de nouveaux types de filaments musculaires ont été découverts. Le muscle au repos peut être étiré jusqu'à ce que les filaments épais et minces ne se chevauchent plus, développant une force de résistance ou une tension passive, qui peut être plus grande que la force normalement développée en contractant le muscle. Si les forces d'étirement sont supprimées, le muscle reprend rapidement sa longueur de repos initiale et l'arrangement initial des filaments épais et fins est rétabli. Cette élasticité est due à de longues

protéines, qui permettent de maintenir les filaments épais et fins dans leur configuration originelle et confèrent au muscle ses propriétés élastiques.

Un composant de ce troisième système de filament est la protéine titine (aussi appelée connectine), qui connecte l'extrémité des filaments épais aux disques Z et s'étend le long du filament épais jusqu'à la zone H. D'autres protéines se lient également à la myosine, telles la protéine C, la protéine H, la protéine M, la myoméline.

1.1.4. Le réticulum sarcoplasmique (RS) et les mouvements de calcium

La cellule musculaire striée possède en plus le sarcolemme et le système des tubules qui séparent le milieu extracellulaire de l'espace intracellulaire, et les systèmes membranaires internes qui délimitent des compartiments. Le réticulum sarcoplasmique est l'un de ces systèmes membranaires : il représente une forme spécialisée du réticulum endoplasmique lisse complexe. Son réseau de tubules enlace chaque myofibrille. La majorité de ces tubules parcourent la myofibrille longitudinalement. D'autres formes de grands canaux transversaux à la jonction des stries A et I.

Les extrémités de chaque segment, dilatées, sont situées au voisinage immédiat des tubules transversaux (tubules T). Les tubules T sont des invaginations de la membrane cellulaire et pénètrent à travers les myofilaments aux niveaux des disques Z, où ils entrent en contact avec les citernes terminales du RS, formant des triades (voir figure 4). Ces citernes latérales du RS sont des réservoirs de calcium. Quand le potentiel d'action gagne les tubules T, du calcium passe du RS vers le cytosol, déclenchant le mécanisme initiateur de la contraction musculaire.

Lors de la relaxation du muscle, la diminution de la concentration cytosolique de calcium est réalisée essentiellement par le recaptage du calcium au niveau du RS via les protéines SERCA (Sarco Endo Reticulum Calcium ATPase) qui sont des pompes à calcium ATP dépendantes. La pompe peut fonctionner dans les deux sens et c'est l'hydrolyse de l'ATP qui permet la séquestration du calcium dans le RS.

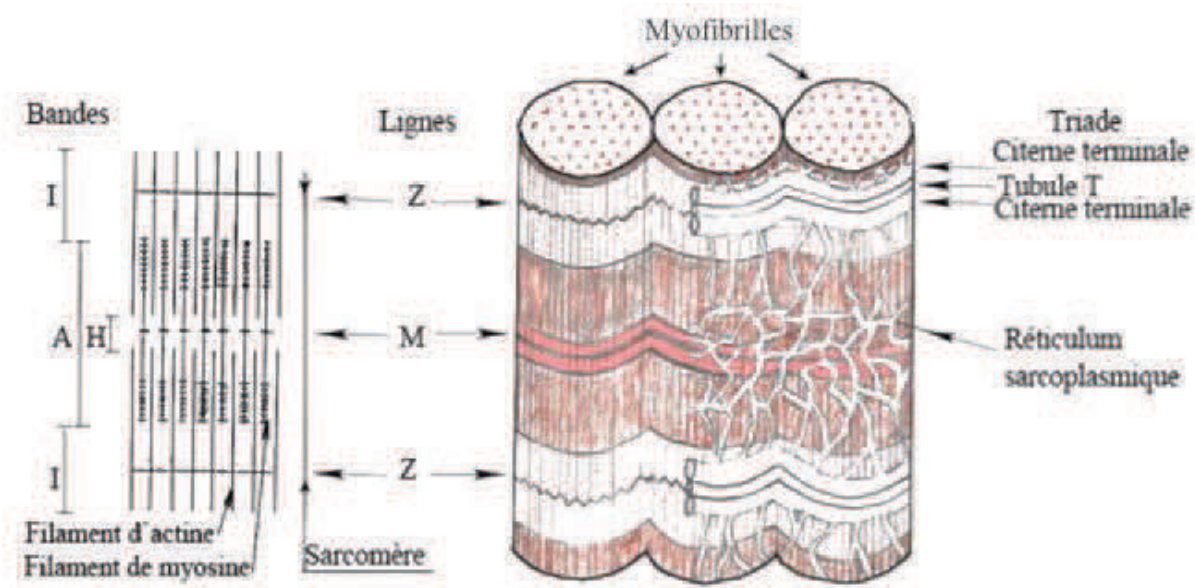


Figure 4. Schéma du réticulum sarcoplasmique. Le sarcoplasme de la fibre musculaire (cytoplasme de la cellule musculaire) est composé de myofibrilles enveloppées de réticulum sarcoplasmique rempli de calcium ionisé Ca^{++} , il est relié au sarcolemme par les excroissances des tubules T (situées au niveau des stries Z des sarcomères). Le sarcoplasme contient du potassium, du magnésium, des phosphates, du glycogène, des lipides. Il contient également des mitochondries, les centrales énergétiques de la cellule. *Schéma adapté par <http://www.iacoach.fr>.*

1.1.5. Mouvement calcique et couplage Excitation-Contraction

Le couplage excitation-contraction consiste en une série d'événements reliant l'excitation du muscle (présence d'un potentiel d'action au niveau de la fibre musculaire) à sa contraction. Les tubules T étant le prolongement de la membrane de surface, le potentiel d'action se propage jusqu'au plus profond de la fibre musculaire. La dépolarisation de la membrane des tubules T est détectée par les récepteurs aux dihydropyridines (DHRPs), qui représentent la majorité des canaux calciques de type L. Des interactions fonctionnelles entre les DHRPs et les récepteurs à la ryanodine du RS sont à la base d'une libération rapide et massive de calcium depuis les réserves internes du RS.

Au repos, la tropomyosine et la TnI (voir [figure 5](#)) masquent les sites de fixation des têtes de myosine sur l'actine. La contraction se produit lorsque la TnC, après avoir fixé du Ca^{++} , change de conformation et déplace la TnI et la tropomyosine. Les têtes de myosine (en oval sur le schéma) ont alors accès à leurs sites de fixation sur l'actine (les ronds blancs). Elles hydrolysent une molécule d'ATP et se replient pour se rapprocher de leur site de fixation et ne libèrent le phosphate inorganique qu'une fois la liaison établie. Le relargage de

l'ADP permet aux têtes de myosine de se replier complètement ce qui provoque le raccourcissement des sarcomères. Le décrochage des têtes de myosine est induit par la fixation d'un nouvel ATP et par la libération du Ca^{2+} de la TnC. Le sarcomère se rallonge, le muscle se relâche.

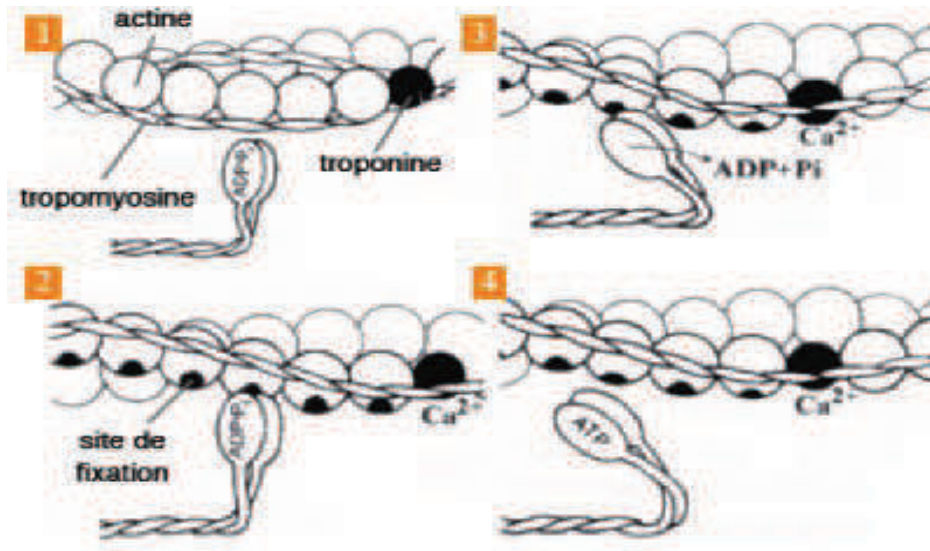


Figure 5. Schéma de la contraction musculaire. 1) Au repos, la tropomyosine masque les sites de fixation de la myosine. La tête de la myosine contient ADP+Pi provenant de l'hydrolyse de l'ATP. 2) L'influx nerveux arrive par le neurone moteur, il s'en suit une libération d'ions calcium par le réticulum sarcoplasmique. Le calcium se fixe à la troponine ce qui change sa conformation et permet le déplacement de la tropomyosine, permettant ainsi la fixation de la tête de myosine sur l'actine. 3) ADP+Pi sont libérés de la myosine ce qui provoque sa flexion et donc la traction du filament d'actine. 4) Une molécule d'ATP se fixe sur une tête d'un filament de myosine ce qui la décroche du filament d'actine. Tant que la concentration de calcium reste élevée, le cycle continue. *Schéma adapté de <http://www.volodalen.com>*

En résumé, cette partie nous a montré que, au niveau des filaments fin, épais et du réticulum sarcoplasmique, il existe différentes isoformes de protéines, qui permettent, en fonction de l'expression de l'une ou de l'autre, d'adapter la structure musculaire et donc les propriétés fonctionnelles du muscle en fonction de son activité contractile.

Les muscles squelettiques sont striés, attachés au squelette et impliqués dans la contraction volontaire.

Les caractéristiques fonctionnelles des muscles sont l'excitabilité, la contractilité, l'extensibilité et l'élasticité.

Les fibres des muscles squelettiques (cellules musculaires ou myocytes) sont protégées et renforcées par des gaines de tissu conjonctif. De la couche profonde à la couche superficielle, on trouve l'endomysium, le périnysium et l'épimysium.

Les myofibrilles sont des éléments contractiles et elles occupent la plus grande partie du volume de la cellule. Leur apparence striée est due à l'alternance régulière de bandes sombres (strié A) et de bandes claires (strié I). Les myofibrilles sont des chaînes de sarcomères: chacun contenant des filaments minces (actine), et épais (de myosin) disposés de façon régulière. Les têtes de molécules de myosine forment des ponts d'union qui interagissent avec les filaments d'actine.

1.1.6. Classification des fibres musculaires striées squelettiques

A l'intérieur d'un muscle, les fibres musculaires striées squelettiques ne sont pas toutes identiques. Elles possèdent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles variables. Plusieurs classifications, basées sur leurs propriétés contractiles ou métaboliques spécifiques, ont été établies. L'activité ATPasique des fibres a tout d'abord été utilisée pour les classer selon leur vitesse de contraction. La combinaison de plusieurs pH d'incubation des fibres selon la méthode de Brooke et Kaiser (Brooke & Kaiser, 1970), a permis de distinguer 3 types de fibres :

- les fibres I appelées fibres lentes
- les fibres IIA et IIB appelées fibres rapides.

D'autres auteurs ont combiné l'expression du type contractile lié à l'activité ATPasique avec le type métabolique lié à l'activité du métabolisme oxydatif révélée par la succinate déshydrogénase (Nemeth & Pette, 1981). Enfin, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les chaînes lourdes de la myosine (MHC) a permis de déterminer un quatrième type de fibres de type intermédiaire, les fibres IIX.

La composition en fibres de type I ou de type II est variable d'un muscle à l'autre et il existe une certaine corrélation entre le type de cellules musculaires striées et les propriétés contractiles du muscle. Chez l'homme sédentaire, la majorité des muscles possède environ 50% de chaque sorte de fibres. Mais certains muscles sont plus riches en fibres lentes (les muscles posturaux) et d'autres en fibres rapides (les muscles de l'activité gestuelle). La proportion de chaque espèce de fibres détermine, une fois l'âge adulte atteint, l'aptitude d'un

mammifère à réaliser un certain type de performance. L'entraînement peut modifier spécifiquement chaque type de fibre mais dans des proportions toutes relatives. En effet, le déterminisme génétique joue également un rôle important.

L'ensemble des cellules musculaires striées qui dépendent d'un même neurone moteur est appelé une unité motrice. Toutes les cellules musculaires d'une unité motrice sont d'un même type, et il semble que le type des cellules musculaires soit déterminé par la cellule nerveuse qui exerce une influence permanente sur elles.

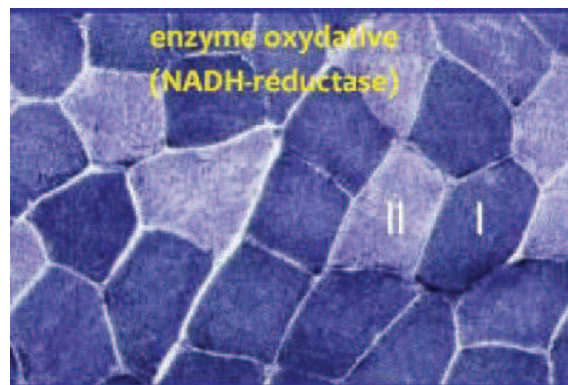


Figure 6 : Marquage au NADH sur une coupe transversale d'un muscle squelettique. Les fibres très colorées correspondent aux fibres de type I alors que les fibres peu colorées correspondent aux fibres de type II (Tiré de l'article (Ogata & Yamasaki, 1997).

1.1.6.1. Les fibres à contraction lente

La fibre de type I, également dénommée S.T. (slow twitch) est une fibre rouge, à contraction lente et à métabolisme essentiellement aérobie oxydatif (Tableau 1). A l'intérieur de cette fibre, l'ATP produit est essentiellement issue du processus de phosphorylation oxydative intra-mitochondriale (Figure 7). Elle a une forte teneur en myoglobine, ce qui lui donne sa couleur. Elle est entourée d'un riche réseau capillaire et elle est spécifiquement équipée pour un métabolisme aérobie et une activité prolongée à faible tension. La vitesse de contraction et la force développée sont faibles mais la fibre de type I est très peu fatigable (Schiaffino, 2010) . On retrouve ce type de fibres notamment chez les marathonien.

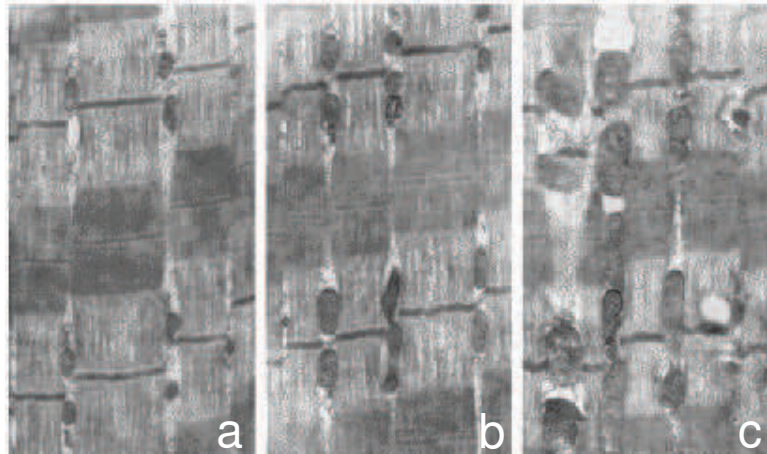


Figure 7: Section longitudinale des fibres rapides, intermédiaires et lentes d'un muscle triceps brachial d'une femme âgée de 25 ans. Ces trois types de muscles ont 2 mitochondries de part et d'autres de la bande I. a) la fibre rapide possède des petites mitochondries de 0.3 μm de diamètre. b) les fibres intermédiaires ont une taille intermédiaire avec une taille de 0.6 μm . c) les fibres lentes ont de grandes mitochondries avec un diamètre de 0.9 μm . (Tiré de l'article (Ogata & Yamasaki, 1997))

1.1.6.2. Les fibres à contraction rapide

➤ - La fibre de type IIa

C'est une classification basée sur le polymorphisme des chaînes lourdes de myosine du muscle squelettique, également dénommée F.T.A (fast twitch A). C'est une fibre blanche rapide mais qui utilise à la fois un métabolisme oxydatif et glycolytique pour produire de l'ATP (Tableau 1). Elle est riche en glycogène et en enzymes glycolytiques et dans une moindre mesure en mitochondries (Figure 7). Elle est moins oxydative que la fibre de type I. C'est une fibre relativement résistante à la fatigue, elle est le point de départ d'une activité phasique prolongée (Schiaffino, 2010).

➤ - La fibre de type IIb

Elle est également dénommée F.T.B (fast twitch B). C'est une fibre blanche phasique. Son métabolisme est essentiellement anaérobie. Elle est pauvre en mitochondries et en enzymes oxydatives. Elle est riche en glycogène et a une très forte activité glycolytique (Tableau 1). Elle est très sensible à la fatigue. Cette fibre est à l'origine d'une puissante activité physique développant une grande force mais de courte durée (Schiaffino, 2010). On retrouve donc ce type de fibres notamment chez les sprinters.

On évoque également des fibres de type IIX, aux caractéristiques (métabolisme oxydatif / glycolytique) intermédiaires entre les fibres de type II A et II B.

1.1.6.3. Les fibres intermédiaires

Appelées aussi fibres de transition, d'autres types de fibres musculaires sont trouvées à l'intérieur du muscle : les fibres II AB et les fibres II C. Ces fibres semblent davantage correspondre à des étapes de transition d'un type de fibre à un autre (Figure 7).

Les fibres musculaires présentent en effet cette particularité de pouvoir évoluer d'un type à un autre, et ce, en fonction de la nature du travail auquel le muscle est le plus fréquemment soumis. Les fibres de type II X, par exemple, sont retrouvées chez les jeunes sujets et réapparaissent lors d'une immobilisation prolongée.

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

Type de fibres/MHC	Fibre I ou ST	Fibre II A ou FT-A	Fibre II B ou FT-B
Couleur	Rouge	Blanche	
Composition intracellulaire dominante	Mitochondries +++ Myoglobine	Mitochondries +/- ATPase de la myosine	
Voie de synthèse de l'ATP	Aérobie	Aéro-anaérobie	Anaérobie
Capacité anaérobie Métabolisme glycolytique	Faible	Moyenne	Elevée
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	
Résistance à la fatigue	Elevée	Moyenne	Faible
Force développée	Limitée	Moyenne	Importante
Taille motoneurone	Petite	Grande	
Source énergétique principale d'ATP	Glucose sanguin et acides gras libres Métabolisme oxydatif aérobie	Créatine phosphate Puis Glucose dérivé du glycogène musculaire et métabolisé par la glycolyse anaérobie	
Utilisation du glycogène musculaire	Lentement épuisé	Rapidement épuisé	
Effort type	Marathon	Sprint	

Tableau 1 : Caractéristiques des fibres de type I et de type II des muscles squelettiques et leurs principales sources d'énergie.

1.1.6.4. Les différents phénotypes métaboliques

Le muscle strié squelettique est constitué de cellules ou fibres musculaires hautement différenciées, compartimentées et spécialisées dans la contraction. Les myofibrilles assurent la contraction, le réticulum sarcoplasmique permet la régulation du calcium et les mitochondries, ainsi que les complexes glycolytiques, la synthèse d'ATP. Le muscle squelettique est ainsi constitué d'une variété de fibres ayant des propriétés fonctionnelles, structurales, biochimiques et métaboliques adaptées à leur activité contractile (Schiaffino & Reggiani, 1994; Schiaffino, 2010). Le muscle rapide glycolytique est adapté à un besoin énergétique intense et bref grâce à une disponibilité immédiate du stock d'énergie cytosolique (phosphocréatine et ATP), grâce à un effet tampon important et dépendant de la réaction catalysée par la créatine kinase et enfin grâce à une activité glycolytique importante (Kushmerick *et al.*, 1992).

Il est également caractérisé par la prédominance de fibres contractiles rapides de type IIB (Brooke & Kaiser, 1970), contenant peu de mitochondries et pauvres en myoglobine et en capillaires (ce qui leur donnent un aspect blanc). Elles sont par contre riches en glycogène. Ce type de muscle a donc un métabolisme essentiellement glycolytique basé sur d'importantes réserves énergétiques rapidement mobilisables, une fatigabilité importante et une récupération décalée dans le temps et assez lente. Les muscles lents à activité soutenue (muscle postural) ou cyclique (cœur) sont essentiellement composés de fibres à contraction lente de type I et à activité ATPasique lente. Ces muscles sont riches en myoglobine (aspect rouge), présentent un réseau capillaire bien développé, une faible réserve en phosphocréatine et un métabolisme essentiellement oxydatif puisque les phosphorylations oxydatives sont la source principale d'énergie chimique utilisée par les myofibrilles durant la contraction. Il est apte à soutenir un effort prolongé, ce qui implique un couplage efficace entre l'utilisation et le renouvellement énergétique et permet un flux énergétique stable et bien ajusté (Ventura-Clapier *et al.*, 1998; Saks *et al.*, 2001). Il existe également des phénotypes intermédiaires comme le muscle rapide-oxydatif composé de fibres IIA et riche en mitochondries.

En résumé,

- *selon la théorie de la contraction par glissement des filaments, les filaments minces sont tirés vers le centre du sarcomère par les têtes de myosine des filaments épais*
- *pendant le couplage excitation-contraction, le potentiel d'action se propage le long des tubules transverses, provoquant ainsi la libération de calcium du réticulum plasmique vers l'intérieur de la cellule*
- *il existe trois types de fibres musculaires: les fibres glycolytiques à contraction rapide (fatigables), les fibres oxydatives à contraction lente (résistantes à la fatigue) et les fibres oxydatives à contraction rapide (modérément résistantes à la fatigue). La plupart des muscles contiennent un mélange de ces différents types de fibres.*

1.2. Caractéristiques métaboliques et voies de synthèse de l'ATP

1.2.1. Les transferts d'énergie au sein de la fibre musculaire

La coordination et la coopération des différentes composantes de l'appareil contractile lors de la contraction requièrent un apport suffisant d'énergie (sous forme d'ATP) au muscle strié squelettique. Il existe deux principales voies de synthèse d'ATP: la glycolyse anaérobie et la phosphorylation oxydative réalisée par la mitochondrie. Selon le fonctionnement musculaire, telle ou telle voie métabolique sera prédominante. Ainsi, schématiquement, un muscle rapide (muscle locomoteur), fatigable et à contraction intense et brève, présente une activité glycolytique importante et des réserves énergétiques importantes, tandis qu'un muscle lent (muscle posturale), le myocarde et le diaphragme qui ont une activité contractile soutenue ou cyclique et qui sont résistants à la fatigue, dépendent de la production mitochondriale d'ATP. L'ATP est reconstitué grâce à trois systèmes énergétiques: 1. Le système ATP-PCr (filiale anaérobie alactique); 2. Le système glycolytique (voie anaérobie); 3. Le système oxydatif (voie aérobie).

1.2.1.1. Le système ATP-PCr (filiale anaérobie alactique)

C'est le premier système qui fournit l'énergie immédiate. Dans le système ATP-PCr, la créatine kinase hydrolyse la phosphocréatine et libère le radical P_i . Ce phosphate inorganique se combine alors avec l'ADP pour reformer l'ATP. Ce système fonctionne sur un mode anaérobie pendant les 15 premières secondes de la contraction musculaire. Cependant, il est rapidement relayé par le système glycolytique en raison de la quantité limitée des stocks de PCr et d'ATP. Il a essentiellement pour but de maintenir le niveau d'ATP. L'énergie ainsi libérée est de 1 mole d'ATP pour 1 mole de PCr.

1.2.1.2. La voie anaérobie

La glycolyse anaérobie est une voie métabolique universelle pour le catabolisme du glucose en pyruvate accompagnée par la formation d'ATP. Ce processus est catalysé par dix enzymes cytosoliques, et tous les intermédiaires sont des composés phosphorylés. Le bilan final de la production d'ATP à partir de cette voie métabolique est relativement faible. Dans la phase préparatoire de la glycolyse, de l'ATP est utilisé pour transformer le glucose en un intermédiaire phosphorylé, le fructose-1,6-bisphosphate, puis la liaison carbone-carbone entre le C-3 et le C-4 est rompue pour fournir deux molécules de trioses phosphate.

L'équation globale de la glycolyse est la suivante :



Pour 1 glucose, il existe donc un gain net de deux ATP seulement. Le NADH formé dans la glycolyse peut être recyclé pour régénérer le NAD^+ qui est nécessaire comme accepteur d'électrons dans la première étape de la phase de remboursement de la glycolyse. Le produit final de la glycolyse anaérobie est le lactate, formé à partir de la réduction du pyruvate par la lactate déshydrogénase (LDH). Cette réaction permet l'oxydation du NADH en NAD^+ :

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{lactate} + \text{NAD}^+$$

Depuis très longtemps, il est connu que le muscle squelettique est le lieu de production de lactate lors de la contraction et cette production de lactate est associée à une oxygénation insuffisante et au déclenchement de la fatigue. Plus récemment, il a été reconnu que le muscle squelettique ne joue pas seulement un rôle important dans la production, mais également dans

la clairance du lactate et ceci a provoqué un intérêt nouveau pour le métabolisme du lactate dans le muscle squelettique (pour revue voir (Van Hall, 2000)).

La LDH est une enzyme tétramérique résultant de l'assemblage de deux types de sous unités, H et M, générant 5 isoformes H4, H3M, H2M2, HM3 et M4. Ces sous unités se distinguent par l'inhibition par le pyruvate : la forme H est la plus sensible à l'inhibition par le pyruvate et favorise donc son oxydation plutôt que sa transformation en lactate. Dans le muscle, un profil isoenzymatique majoritairement en LDH H reflète un métabolisme de type oxydatif tandis qu'une majorité en sous unité M indique une prédominance de la glycolyse anaérobie.

Les enzymes de la glycolyse sont solubles ou associées à différentes structures cellulaires où elles forment des complexes, appelés complexes glycolytiques. Ces complexes sont localisés :

- au niveau du sarcolemme ou adjacents au cytosquelette de sorte que les canaux ioniques utilisent préférentiellement l'ATP fourni au cours de la glycolyse (Weiss & Lamp, 1987).
- au niveau du RS où ils sont fonctionnellement couplés avec le transport du calcium par les SERCA (Xu *et al.*, 1995; Boehm *et al.*, 2000);
- au niveau des filaments fins.

Cette compartimentation des enzymes est responsable d'une microcompartimentation de l'ATP aux sites d'utilisation de l'énergie.

Lors d'un effort prolongé (exemple du coureur de fond départ arrêté), le muscle squelettique fait tout d'abord appel à l'ATP présent dans le sarcoplasme, qu'il hydrolyse d'une façon très rapide. Cet ATP est aussitôt régénéré grâce au système de la créatine kinase qui utilise les réserves en créatine phosphate. Pendant ce temps, le muscle produit de l'AMPc (grâce au signal neuro-endocrinien) qui déclenche la glycogénolyse. Le glucose 6-phosphate formé est immédiatement oxydé en lactate par la glycolyse anaérobie. L'augmentation du débit cardiaque permet l'augmentation de l'apport en oxygène afin que la glycolyse se déroule en aérobie, ce qui augmente le rendement d'utilisation du glucose 6-phosphate et du glucose plasmatique provenant de la glycogénolyse du foie. Enfin, l'oxygène étant apporté en quantité suffisante, l'adrénaline active la lipolyse du tissu adipeux et fournit des acides gras

aux muscles qui atteignent alors le meilleur rendement. Pour des intensités d'exercice élevées, l'apport en pyruvate par la voie de la glycolyse dépasse les capacités d'oxydation, provoquant l'accumulation de protons et de lactate dans les tissus. Ainsi, pour une intensité d'exercice élevée, le flux glycolytique contribue significativement à maintenir des réserves en ATP constant, mais provoque une accumulation de protons et de lactate dans la cellule musculaire puis dans le sang.

1.2.1.3. La voie aérobie

Les nutriments utilisés dans la voie anaérobie, qui a lieu dans le cytoplasme des cellules, sont donc soit inclus dans la synthèse de lipides, de protéines et de glycogène par des voies anaboliques, soit dégradés en acide pyruvique et en acétyl CoA par des voies cataboliques. La glycolyse aérobie se poursuit dans la mitochondrie où le pyruvate va être oxydé via le cycle de Krebs (voir figure 8). Le bilan de la production d'ATP devient beaucoup plus important puisque 36 molécules sont produites après l'oxydation complète d'une molécule de glucose. Mais d'autres substrats sont également disponibles, avec en particulier la possibilité d'oxyder les acides gras via la β -oxydation. L'étape ultime est la réduction de l'oxygène et la production mitochondriale d'ATP lors de la phosphorylation oxydative.

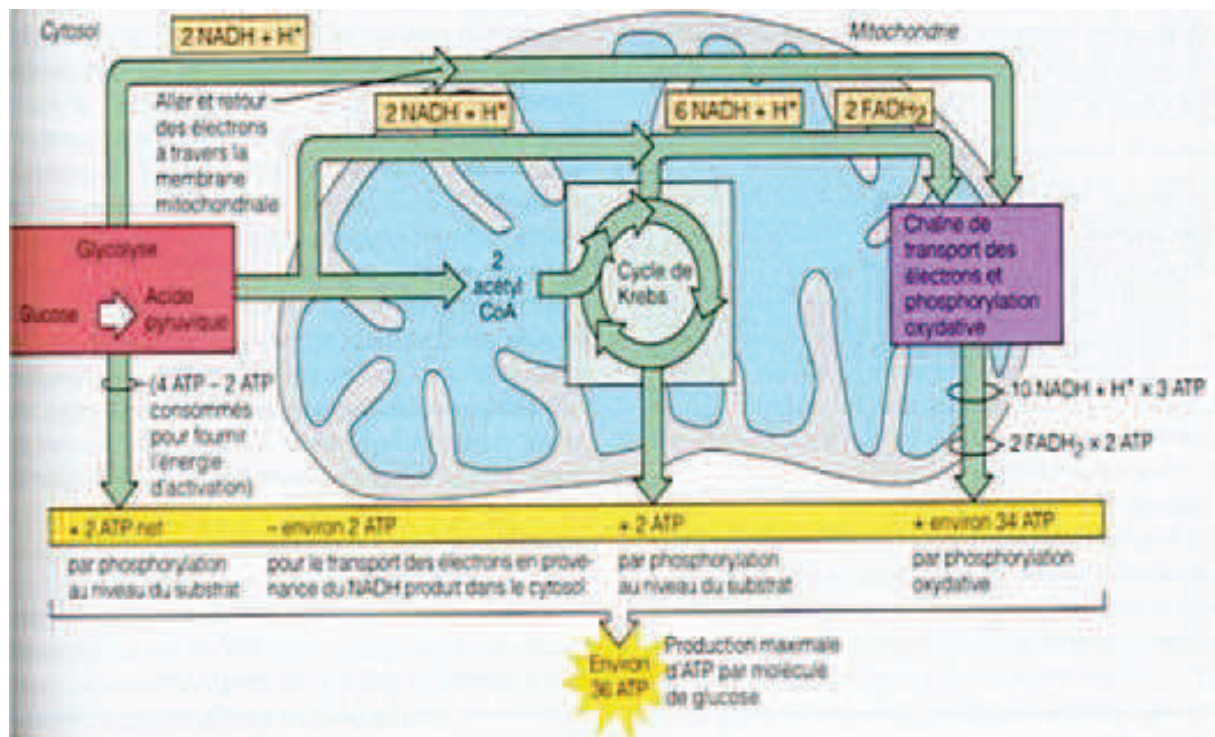


Figure 8. Schéma du métabolisme des substrats énergétiques. Le glucose est la principale molécule combustible des voies oxydatives pour la production d'ATP. Le catabolisme complet du glucose débute par sa transformation en glucose-6-phosphate qui permet son entrée dans la glycolyse, puis suite à plusieurs transformations, les différentes molécules passent dans le cycle de Krebs, la chaîne de transport des électrons et la phosphorylation oxydative. Pour chaque molécule de glucose qui entre dans ces voies, un maximum de 36 molécules d'ATP sont formées. *Schéma adapté de E N. Marieb; 6^{ème} édition.*

1.2.1.4. Les différents substrats énergétiques mitochondriaux

La voie aérobie représente la dernière étape de production d'ATP. Correspondant à la fin de dégradation des substrats, elle se déroule dans la mitochondrie et nécessite de l'oxygène. Tout mouvement requiert de l'énergie fournie par la dégradation de substrats couplés à la production d'ATP, soit de manière anaérobie, soit en présence d'O₂. Selon les caractéristiques de l'exercice physique, on observe une utilisation préférentielle du métabolisme anaérobie ou aérobie. Ainsi, pour des exercices d'endurance, c'est le métabolisme aérobie qui est privilégié. Les mitochondries sont les organes centraux de la fourniture d'énergie aérobie. Pour ce faire, divers substrats tels que le glycogène ou les acides gras sont dégradés en suivant le cycle de Krebs ou bien la β -oxydation. Ce chapitre va nous

permettre de déterminer le rôle de la mitochondrie et de détailler les différentes voies métaboliques permettant la fourniture d'énergie sous forme d'ATP.

Les capacités d'endurance des muscles sont déterminées par les capacités des mitochondries à oxyder les substrats énergétiques par le processus de la phosphorylation oxydative (PHOSPHOX) pour produire un flux d'ATP suffisant. Dans les muscles de mammifères, la limitation du transfert des hydrates de carbone et des lipides de la micro circulation à la cellule musculaire est atteinte pour des intensités d'exercice modérées (40%-50% de la VO_2max). A une intensité plus élevée, ce sont les réserves en substrats intracellulaires qui doivent être utilisées pour l'oxydation. Ainsi, ces réserves intracellulaires jouent un rôle fondamental dans les capacités d'endurance et surtout pour la réalisation de performance sportive. En effet, il est bien connu que les cellules musculaires des athlètes en endurance sont constituées de réserves extrêmement importantes en substrats (Hoppeler, 1986).

Les réserves en substrats se trouvent principalement dans le foie, le tissu adipeux et dans les muscles. Dans ces derniers, le glucose est stocké sous forme de granules de glycogène et les acides gras sous forme de gouttelettes de lipides. Ces gouttelettes sont en contact direct avec la membrane externe de la mitochondrie (Vock *et al.*, 1996). Les acides gras étant peu solubles dans le cytosol, cette juxtaposition facilite l'entrée des acides gras dans la mitochondrie. Ainsi, les mitochondries intermyofibrillaires dépendent essentiellement de la présence des gouttelettes de lipides pour métaboliser les acides gras. Ces acides gras à longue chaîne sont importés dans la mitochondrie par un système transporteur spécifique comportant les deux isoformes 1 et 2 de la carnitine palmityl transférase. Une fois dans la matrice mitochondriale, les acides gras sont dégradés par les enzymes responsables de la β oxydation, donnant des molécules d'acétyl coenzyme A, intermédiaire commun au catabolisme des acides gras et du glucose. L'acétyl coenzyme A va ensuite être oxydé lors de son passage dans le cycle de Krebs afin de permettre la réduction des équivalents réducteurs (NADH, FADH₂). Pour un exercice d'intensité élevée, les substrats doivent être transportés à l'intérieur de la mitochondrie à une vitesse suffisante pour alimenter la PHOSPHOX. A une intensité proche de VO_2max , plus de 80% des substrats sont apporté par le glycogène musculaire, seul 20% étant apportés par voie sanguine, car le flux d'apport en substrat est limité par leur passage à travers la membrane sarcolemmale (Vock *et al.*, 1996). Les

mécanismes permettant de contrôler la balance entre le métabolisme glucidique et lipidique est un sujet qui reste encore largement à débattre. L'augmentation de l'utilisation des acides gras lors d'un exercice à long terme de faible intensité est certainement liée à l'augmentation des acides gras libres plasmatiques (Romijn *et al.*, 1993; Jeukendrup *et al.*, 1998a, 1998b).

Les muscles sont métaboliquement hétérogènes, ce qui a pour conséquence une utilisation des substrats qui va être dépendante du métabolisme préférentiel du muscle. Le muscle oxydatif a une capacité de transport du lactate et une capacité de transport du glucose stimulé par l'insuline qui est supérieure par rapport au muscle glycolytique grâce à des transporteurs protéiques pour le lactate (monocarboxylate transporter 1) (Handberg *et al.*, 1996) et le glucose (GLUT-4) (Jóhannsson *et al.*, 1996) exprimés de façon plus importante dans le muscle oxydatif.

Le muscle oxydatif manifeste une capacité à oxyder les acides gras qui est supérieure à celle du muscle glycolytique (Dyck *et al.*, 1997), grâce notamment à une vitesse de transport du palmitate qui est supérieure, due à une quantité plus importante de transporteurs des acides gras à longue chaîne (Bonen *et al.*, 1998). D'autre part, il a été montré sur mitochondries isolées que la capacité à oxyder le pyruvate est similaire entre les deux types de muscle (Pande *et al.*, 1971) ou seulement de 1,3 fois supérieure dans le muscle oxydatif (Jackman & Willis, 1996) alors que la capacité à oxyder le glycérol 3-phosphate est dix fois supérieure dans les mitochondries du muscle glycolytique, démontrant l'importance de la navette du glycérol 3-phosphate uniquement dans ce type de muscle.

1.2.1.5. Les mitochondries

La mitochondrie est une bactérie originellement indépendante, riche en composants biochimiques dont l'objectif majeur est la production d'énergie. Elle comporte plusieurs copies de son propre ADN (mtADN) distinct de l'ADN nucléaire (Wiesner *et al.*, 1992) qui est localisé dans la matrice mitochondriale. Le mtADN est uniquement transmis par la mère puisque les mitochondries du spermatozoïde sont localisées dans la pièce intermédiaire qui reste à l'extérieur. Cependant, le mtADN encode seulement pour une fraction de 13 protéines fondamentales pour la fonction mitochondriale et plus particulièrement pour les complexes de la chaîne respiratoire (Zeviani & Di Donato, 2004; Taylor & Turnbull, 2005). Les protéines restantes (environ 850) sont encodées dans le noyau et transportées dans la mitochondrie. En

plus d'assurer l'approvisionnement cellulaire en énergie, les mitochondries ont d'autres rôles vitaux pour le bon fonctionnement de la cellule.

➤ **Rôle et importance**

La mitochondrie est un organe hautement spécialisé dans la transformation de l'énergie des cellules eucaryotes. Elle permet de fournir l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire, en produisant de l'ATP à partir de l'ADP grâce au processus de la PHOSPHOX. La mitochondrie est séparée du cytosol par une double membrane. La membrane interne est invaginée et délimite la matrice de l'organelle (Figure 9). Les cinq complexes enzymatiques de la PHOSPHOX sont ancrés dans cette membrane.

En plus d'assurer l'approvisionnement cellulaire en énergie, les mitochondries ont différents rôles également vitaux pour le bon fonctionnement de la cellule. La mitochondrie participe à l'homéostasie calcique, la régulation du pH intracellulaire, la synthèse d'hormones stéroïdes et des hèmes, ainsi qu'à la régulation de la thermogenèse. Elle constitue un des principaux sites de production des radicaux libres, essentiellement produits au niveau du complexe I et III de la chaîne respiratoire sous forme d'anions superoxydes. Lorsque la production de ces superoxydes dépasse les capacités anti-oxydantes de la cellule, des dommages peuvent apparaître dans la cellule au niveau des protéines, des lipides et de son ADN. Par la production de ces radicaux libres, ainsi que d'autres stimuli apoptotiques, les mitochondries sont impliquées dans les processus de contrôle de l'apoptose (mort cellulaire programmée) (von Harsdorf *et al.*, 1999), ainsi que dans le phénomène de nécrose (mort cellulaire accidentelle). Ainsi, la mitochondrie est très sensible aux changements de conditions cellulaires et est donc essentielle à la (sur)vie de la cellule. C'est un véritable "senseur" de l'homéostasie intracellulaire.

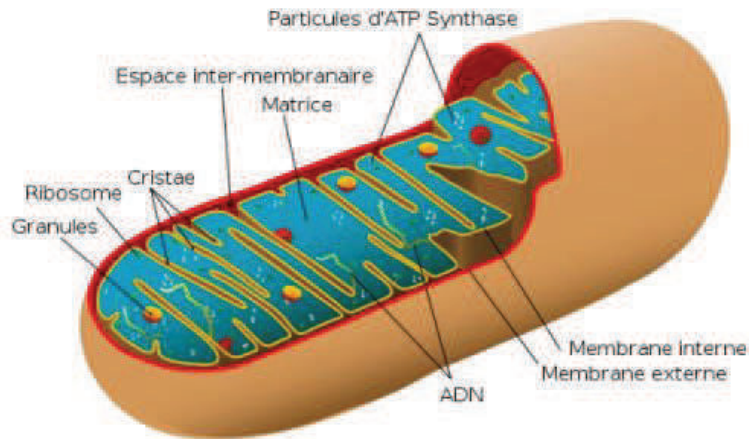


Figure 9 : Structure d'une mitochondrie. La mitochondrie est composée de deux membranes, externe et interne, délimitant un espace inter-membranaire et une matrice. Les replis caractéristiques de la membrane interne sont appelés crêtes mitochondriales ou cristae. *Schéma tiré de wikipédia.*

➤ **Distribution dans la cellule musculaire**

L'utilisation de sondes fluorescentes a permis de montrer que les mitochondries forment un réticulum ou un réseau dynamique et continu qui entrent continuellement en fusion ou en fission (Duchen, 2004). Ces analyses ont permis de regrouper les mitochondries en deux groupes: les mitochondries inter-fibrillaires et subsarcolemmales. Ces deux populations présentent des propriétés biochimiques et des niveaux d'activités enzymatiques différents et semblent répondre différemment au stress métabolique (Lesnefsky & Hoppel, 2003). Les mitochondries sont ancrées dans la cellule grâce à des protéines du cytosquelette et peuvent se déplacer grâce à des protéines dites motrices telles que les myosines, la dynéine ou la kinésine. Dans les cellules musculaires oxydatives, les mitochondries inter-myofibrillaires ont un arrangement cytoarchitectural assimilable à un cristal permettant d'optimiser le transfert d'énergie (Vendelin *et al.*, 2005).

Les muscles squelettiques possèdent un contenu variable en mitochondries. Elles peuvent occuper 1% du volume cellulaire dans les muscles glycolytiques et jusqu'à 6 à 30 % dans les muscles oxydatifs.

➤ **La membrane mitochondriale externe**

C'est une membrane rigide dans laquelle un nombre important de protéines sont enchâssées. Ces protéines permettent les échanges entre le cytosol et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie en formant des pores qui autorisent, d'une part la

translocation de protéines (TOM), et d'autre part permettent les échanges de métabolites de petit poids moléculaire via des porines. La porine, également appelée voltage dépendant anion channel (VDAC) est la principale voie par laquelle transitent les métabolites régulant la respiration mitochondriale. Les trois isoformes dénombrés chez les mammifères (VDAC1, VDAC2, VDAC3) présentent des différences de perméabilité et joueraient un rôle différent dans la régulation de la fonction mitochondriale (Anflous *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999).

➤ **L'espace intermembranaire**

L'espace inter-membranaire se situe entre les deux membranes et contient des protéines qui jouent un rôle majeur dans l'énergétique mitochondriale et la mort cellulaire (Duchen, 2004). La créatine kinase mitochondriale (mi-CK) occupe un rôle prépondérant dans le transfert d'énergie. Fixée sur la membrane interne, elle a un accès privilégié à l'ADP, généré dans la matrice mitochondriale et transporté dans l'espace inter-membranaire par l'adénine nucléotide translocase (ANT). La mi-CK, également couplée à la membrane externe, pourrait être impliquée dans la régulation de l'importation de créatine dans l'espace inter-membranaire et dans l'exportation de la PCr dans le cytosol (Ventura-Clapier *et al.*, 2004).

➤ **La membrane mitochondriale interne**

La membrane interne présente une perméabilité réduite et sélective, elle forme la barrière la plus distincte entre le cytosol et la matrice mitochondriale. Cette perméabilité sélective permet de maintenir un gradient de concentration pour les protéines, les ions et les métabolites. Des transporteurs permettent les échanges entre les compartiments et participent au bon fonctionnement de la mitochondrie :

- Les complexes de la chaîne respiratoire sont représentés par 5 complexes protéiques, dont l'ATP synthase, ancrés dans la membrane interne. Ils assurent le maintien du gradient de proton et la formation d'ATP.
- L'ANT est constituée de deux sous-unités de 32 kDa et d'un site unique de liaison à l'ATP ou l'ADP. Selon sa conformation, elle fait face, alternativement, à la matrice ou à l'espace inter-membranaire. L'ATP mitochondriale est échangée par l'ADP cytosolique dans un rapport 1:1. L'ANT est exprimé par trois isoformes : ANT1, ANT2 et ANT3. Chez l'Homme et le rat, ANT1 est l'isoforme exprimée de manière prédominante dans le muscle cardiaque et squelettique, ANT2 est ubiquitaire, exprimée dans tous les tissus en quantité variable en fonction de l'activité respiratoire du tissu. ANT3 a un faible niveau d'expression dans le cerveau, le foie, le rein, le cœur et les muscles squelettiques.

- Les protéines découplantes (UCPs) sont enchâssées dans la membrane interne et permettent le passage de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire. Ce phénomène de fuite protonique induit un couplage incomplet entre les phosphorylations et les oxydations, appelé respiration mitochondriale découplée. Une partie de l'énergie est ainsi perdue sous forme de chaleur. Concernant le rôle physiologique de ce découplage, il se pourrait que cette fuite des protons permette de diminuer la production des radicaux libres par une augmentation de l'oxydation de l'ubiquinone, et donc minimise le stress oxydant et les dégâts inhérents au niveau de l'ADN (Brand, 2000). Les UCPs joueraient donc un rôle de protection contre le stress oxydant (Echtay *et al.*, 2002).

➤ **La matrice mitochondriale**

La matrice est le compartiment interne de la mitochondrie délimité par la membrane interne, et contient des centaines d'enzymes nécessaires au cycle de Krebs et à la β -oxydation des acides gras, ainsi que l'ADN mitochondrial codant pour des protéines composant certaines sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire, des ribosomes mitochondriaux, des tRNA, des rRNA et des enzymes nécessaires à l'expression de l'ADN.

➤ **L'ADN mitochondrial**

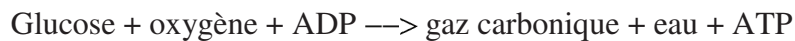
L'ADN mitochondrial (mtADN) humain est une molécule d'ADN bicaténaire circulaire d'environ 16 kilobases dépourvue d'introns et d'histones que l'on retrouve dans la mitochondrie. Chaque mitochondrie possède un nombre variable de copies (2 à 10) et une mutation de cet ADN peut être présente sur toutes les copies (homoplasmie) ou seulement sur une partie des copies (hétéroplasmie). Cette molécule d'ADN code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiques, spécifiques au fonctionnement de la mitochondrie. Ces dernières sont d'ailleurs transmises uniquement par la mère.

1.2.1.6. La respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale produit, à partir des substrats énergétiques et de l'oxygène, des molécules d'ATP qui fournissent l'énergie nécessaire à l'activité cellulaire. Ainsi, la respiration cellulaire est un mode de production de liaisons riches en énergie (sous forme d'ATP) qui se caractérise par des oxydations phosphorylantes actives au sein d'une membrane riche en cytochromes, un gradient ionique doublé d'un potentiel de membrane

comme rôle d'intermédiaire entre oxydation et phosphorylation (couplage), dont l'accepteur final d'électrons est l'oxygène.

Habituellement, l'oxydation d'1 mole de glucose permet l'obtention de 36 moles d'ATP par la voie appelée glycolyse aérobie. Pendant la respiration cellulaire aérobie, qui comprend la glycolyse et les réactions qui ont lieu dans les mitochondries, le glucose est entièrement dégradé. Ainsi, les molécules obtenues lors de cette dégradation sont: des molécules d'eau, du gaz carbonique et de grandes quantités d'ATP.



Ce processus a comme inconvénient d'être relativement lent à cause de ses nombreuses étapes, sans compter qu'il nécessite un apport continu d'oxygène et de nutriments pour se maintenir en activité.

1.2.1.7. La chaîne de transport des électrons et phosphorylation oxydative

Lors de la respiration aérobie, une très grande majorité de l'ATP est produite par la chaîne de transport des électrons (voir figure 10). Les coenzymes réduits (NADH, H⁺ et FADH₂) produits par la glycolyse et surtout lors du cycle de Krebs, vont être réoxydés par cette chaîne de transport des électrons. La synthèse d'ATP mitochondrial résulte d'un couplage entre les oxydations d'équivalents réducteurs et la phosphorylation de l'ADP, que nous appellerons le couplage OXPHOS, et implique cinq complexes à multiples sous-unités, insérés dans la membrane interne de la mitochondrie (pour revue voir (Saraste, 1999)). La chaîne de transport des électrons est une suite de molécules fixées sur la membrane interne de la mitochondrie qui sont disposées dans un ordre décroissant d'affinité pour les électrons. Les électrons provenant des coenzymes réduits se déplacent donc le long de la membrane sur la chaîne de transport. Les électrons en se déplaçant font sortir des protons (H⁺) dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie.

L'accumulation de protons fait fonctionner l'ATP synthétase (une pompe à protons) qui utilise le reflux de protons pour fabriquer de l'ATP. En somme, la seule augmentation de la concentration d'ADP dans la matrice de la mitochondrie (grâce à l'ADP/ATP translocase) suffit à accélérer toutes les réactions des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Réciproquement, l'absence d'ADP dans la matrice provoque le ralentissement des oxydations et donc des activités de toutes les enzymes.

Selon la théorie chimio-osmotique de Mitchell, il existe cinq ensembles de protéines et de coenzymes impliqués dans les oxydations phosphorylantes de la chaîne respiratoire. Les 4 premiers complexes (I, II, III et IV) interviennent dans le transport des électrons et le cinquième (V) intervient dans la synthèse d'ATP. Ces complexes diffusent de façon indépendante au sein de la membrane interne et sont connectés par un transporteur liposoluble mobile le coenzyme Q (CoQ) et le cytochrome C fixé à la membrane.

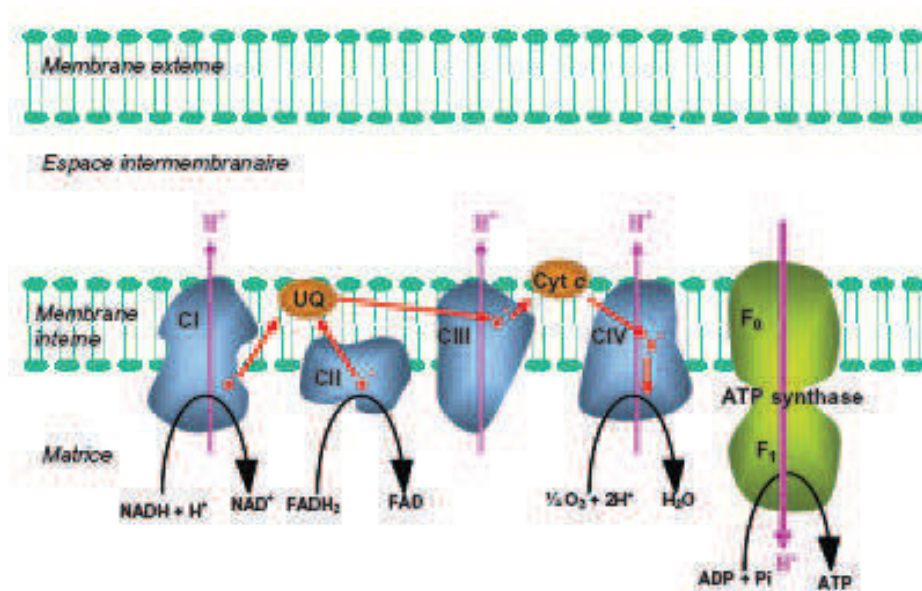


Figure 10 : Chaîne de transport des électrons. Les électrons sont apportés au niveau de la chaîne respiratoire par les équivalents réducteurs : NADH (complexe I) et FADH₂ (complexe II). L'électron est ensuite amené au niveau du complexe IV où il est utilisé pour former de l'eau. Le passage de l'électron au niveau des complexes I, III et IV entraîne le passage de protons (H⁺) dans l'espace inter-membranaire et crée un gradient protonique qui va permettre la formation ATP lors du passage des protons au niveau de l'ATP synthase. *Schéma simplifié et adapté de www.cours-pharmacie.com.*

La chaîne respiratoire mitochondriale est associée aux crêtes de la membrane interne des mitochondries dont une est schématisée ci-dessus. Cette membrane sépare la matrice (en bas sur le schéma) de l'espace intermembranaire (en haut sur le schéma). Dans la membrane interne on rencontre les principaux complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire. Les

substrats et les produits, portés par des coenzymes, sont des couples d'oxydoréduction indiqués sur cette [figure 10](#) par des flèches de la forme réduite vers la forme oxydée.

Ainsi, le complexe I (NADH-ubiquinone réductase, en haut à gauche sur le schéma), oxyde le NADH en NAD⁺, réduit le coenzyme Q en coenzyme QH et pompe des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

Le complexe II (Succinate-ubiquinone réductase), oxyde le succinate (succinate déshydrogenase) en fumarate et réduit le coenzyme Q en coenzyme QH₂. Ainsi, il est responsable de l'oxydation du FADH₂, formé dans le cycle de l'acide citrique, libérant des électrons qui sont dirigés vers le complexe III via l'ubiquinone. Il est l'unique complexe qui n'est pas codé par l'ADN mitochondriale (mtADN).

Le complexe III (Ubiquinone-cytochrome C réductase), oxyde le coenzyme QH₂ en coenzyme Q, réduit le cytochrome c ferrique en cytochrome c ferreux et pompe des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. A savoir qu'il y a deux transporteurs mobiles d'électrons. Le premier est l'ubiquinone, il diffuse dans la membrane mitochondriale et transfère les électrons entre le complexe I et le complexe III. Le second est le cytochrome c, qui se déplace par diffusion sur la membrane de la mitochondrie et transfère ainsi les électrons entre les complexes III et IV.

Le complexe IV (Cytochrome c oxydase), catalyse la dernière étape de la chaîne de transport d'électrons. Un autre nom pour ce complexe est la cytochrome c oxydase, qui résulte de sa réaction catalysée, à savoir l'oxydation du cytochrome c. Le complexe réduit l'oxygène en eau et pompe des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Environ 90% de l'O₂, capté par la cellule, est utilisé par cette cytochrome c oxydase. De plus une partie des molécules d'oxygène (cyanure, acide et monoxyde de carbone) inhibe le complexe IV. Ces molécules peuvent également se lier à Fe⁺⁺ et donc bloquer le site de liaison d'O₂. C'est un système de stockage d'électrons qui réduit complètement les composants de la chaîne respiratoire. Ainsi, le gradient de protons ne peut être maintenu et l'ATP ne peut pas être synthétisé.

L'activité de pompage des protons par les complexes I, III et IV conduit à une concentration différente des protons. Il s'agit alors d'un gradient de concentration de protons qui se manifeste par une différence de pH entre la matrice et l'espace intermembranaire, ce dernier étant plus acide que la matrice (Maechler & Wollheim, 2001).

Le complexe V (ATP synthase) laisse au contraire revenir les protons de l'espace intermembranaire vers la matrice et utilise l'énergie produite pour phosphoryler l'ADP en ATP. Deux protéines transporteuses (ATP-translocase et porine) permettent enfin au coenzyme ATP/ADP de passer à travers les membranes (Lamson & Plaza, 2002). Environ 90% de l'ATP total formé au cours de la respiration cellulaire est produit au cours de cette phosphorylation oxydative.

Tous les complexes de la chaîne de respiration mitochondriale sont composés de plusieurs sous-unités protéiques. Seul le complexe II est entièrement codé dans le noyau tandis que les autres complexes résultent de l'association de protéines codées par les ADN nucléaire et mitochondrial (Kirby *et al.*, 2004; Zeviani & Di Donato, 2004; Taylor & Turnbull, 2005).

Cependant, il apparaît que la chaîne de transport des électrons est imparfaite. Ainsi il arrive que le dioxygène (O_2) soit réduit en anions superoxyde (O_2^-) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) au niveau du complexe IV. Ensemble ces deux composés génèrent des radicaux hydroxyles (OH^-) extrêmement réactifs (Beckman & Ames, 1998). Les radicaux hydroxyles (OH^-) sont responsables de la destruction oxydative de biomolécules.

$L'O_2^-$, H_2O_2 et OH^- sont les trois principaux RLO (radicaux libres oxygénés)

1.2.1.8. La phosphorylation oxydative (PHOSPHOX)

La PHOSPHOX est le principal processus responsable de la production d'énergie sous forme d'ATP. La demande en ATP d'un muscle n'est pas constante dans le temps et passe régulièrement par des phases de transition d'un état de repos à un état actif où la demande en énergie peut s'accroître de 10 à 100 fois dans le muscle squelettique (Dudley *et al.*, 1987). Par conséquent, la PHOSPHOX doit être « renseignée » sur le besoin énergétique afin d'en adapter sa production. Il se pose donc la question de savoir quel est le (les) mécanisme(s) permettant l'activation de la PHOSPHOX afin d'adapter la production à la demande en

énergie. Une quantité importante d'études ont été réalisées, notamment sur des préparations de mitochondries isolées, mais aucune n'a permis d'expliquer clairement les mécanismes régulant le métabolisme énergétique ainsi que sa régulation *in vivo* (Saks *et al.*, 1995). En effet, il a été démontré, dans le cœur que la concentration cytosolique en ADP ne varie pas avec l'élévation du travail musculaire, ce qui implique qu'un simple modèle de rétrorégulation par élévation de la concentration en ADP cytosolique n'est pas un mécanisme adéquat pour expliquer la régulation de la PHOSPHOX. Ainsi, Balaban démontre que potentiellement, il existe plusieurs sites de contrôle de la PHOSPHOX, qui se situent globalement à trois niveaux différents :

- 1) au niveau de la vitesse de délivrance des équivalents réducteurs à la chaîne respiratoire,
- 2) au niveau de la vitesse de production de l'ATP à partir de l'ADP et Pi,
- 3) au niveau de la formation d'eau à partir de l'oxygène et du cytochrome aa3 (Balaban, 1990).

Korzeniewski, quant à lui, a proposé, grâce à un modèle de régulation de la PHOSPHOX simulé par ordinateur, que chaque étape de la PHOSPHOX serait directement activée par des effecteurs externes (Korzeniewski & Zoladz, 2001).

➤ **Rendement et contrôle de la PHOSPHOX**

Les équivalents réduits, NADH, H⁺ et FADH₂ sont respectivement oxydés au niveau des complexes I et II de la chaîne respiratoire. Court-circuitant le complexe I, le nombre de protons expulsés par molécule d'oxygène durant l'oxydation du FADH₂ est plus faible que celui de l'oxydation du NADH, H⁺. Ainsi, le rendement de la phosphorylation oxydative, qui peut être mesuré par le rapport entre les flux d'ATP et d'oxygène (J_{ATP}/J_{O_2}), est plus faible avec FADH₂ qu'avec NADH, H⁺. De ce fait, la différence essentielle entre le catabolisme du glucose et celui des acides gras tient à la proportion relative des équivalents réduits fournis à la chaîne respiratoire : le rapport NADH, H⁺ sur FADH₂ est respectivement de 4 lors de l'oxydation du glucose et de 2 pour celle des acides gras. Cette différence est donc à l'origine de la perte de rendement de la phosphorylation oxydative pour les acides gras.

Chance conclut que le premier facteur du contrôle de la phosphorylation oxydative est la concentration d'ADP extra-mitochondriale (Chance, 1965). En effet, il observe une relation hyperbolique entre le niveau de respiration mitochondriale et cette concentration en ADP. Ceci implique que l'adénine nucléotide translocase (ANT), qui permet la sortie de l'ATP et

l'entrée de l'ADP dans la mitochondrie, contribue également à la régulation de la respiration. Toutefois, l'ADP extra-mitochondriale n'est pas le seul paramètre contrôlant la phosphorylation oxydative. En effet, d'autres facteurs jouent des rôles déterminants :

- 1°) la concentration extra-mitochondriale en phosphate inorganique (Pi)
- 2°) l'approvisionnement en H⁺, fourni par les différents substrats
- 3°) l'activité du cytochrome c oxydase (complexe IV) (Tager *et al.*, 1983).

Dans les conditions de métabolisme basal, 90% de l'O₂ est consommé au niveau de la mitochondrie. De cette consommation mitochondriale, 80% sont utilisés pour la synthèse d'ATP et 20% lors de la fuite de protons. La fuite de protons est caractérisée par le retour passif de protons dans la matrice (proton leak) et ceci sans passer par l'ATP synthase donc sans générer d'ATP. Ces fuites membranaires diminuent la force protomotrice et induisent une baisse de l'efficacité de l'oxydation phosphorylante (Murphy, 1989).

Le cytochrome c oxydase (Cox), accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire (Weibel *et al.*, 1991), est une enzyme cruciale pour la respiration mitochondriale. Elle fait partie du complexe IV de la chaîne respiratoire, et permet de catalyser la réaction suivante :



Cette réaction représente une étape participant à la limitation de la vitesse de la phosphorylation oxydative.

➤ Les substrats de l'oxydation

Une part importante du contrôle de la respiration est exercée au niveau de l'apport en coenzymes réduits (NADH, H⁺ et FADH₂). Une augmentation de l'apport en substrats respiratoires stimule la respiration mitochondriale. Néanmoins cette stimulation de la respiration par l'augmentation de la concentration en substrats est tissu-dépendante. En effet, une modification du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial *via* un changement de la concentration en substrats respiratoires entraîne une augmentation de la vitesse de respiration et de la synthèse d'ATP sur mitochondries isolées de foie (Koretsky & Balaban, 1987), et de cœur, mais ces résultats n'ont pas été retrouvés dans le muscle cardiaque *in vivo* (Jöbsis & Stainsby, 1968), ni dans le muscle squelettique *in vivo* (Wendt & Chapman, 1976) ou *in situ* sur fibres perméabilisées (Kunz *et al.*, 1993). De la même manière, en fonction du substrat utilisé (pyruvate, acides gras), la vitesse maximale de respiration mitochondriale varie au sein

d'un même muscle et n'atteint pas le même niveau en fonction du type de muscles (Ponsot *et al.*, 2005).

➤ Rôle de l'ADP et l'ATP

Les premiers travaux sur mitochondries isolées menés par Lardy et Wellman (1952) ont montré que la vitesse de respiration mitochondriale est fortement augmentée en présence d'un système de régénération de l'ADP (hexokinase + glucose) (Lardy & Wellman, 1952; Chance, 1965). Ces observations aboutirent à la notion de "contrôle respiratoire", défini comme étant le contrôle de la vitesse de transport des électrons le long de la chaîne respiratoire par la concentration cytosolique en ADP. La théorie chimio-osmotique permet d'expliquer ce phénomène, puisque l'ajout d'ADP stimule le fonctionnement de l'ATP synthase et induit ainsi une augmentation de la consommation du gradient de protons. La diminution de ce gradient stimule alors le fonctionnement des pompes à protons mitochondriales et donc la respiration.

La respiration mitochondriale mesurée *in situ*, grâce à la technique des fibres musculaires perméabilisées à la saponine (Veksler *et al.*, 1987) a permis de mettre en évidence que, dans le cœur, il existait une barrière de diffusion de l'ADP au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Saks *et al.*, 1993, 1995). Cependant, on ne retrouve pas cette barrière de diffusion lorsque les mesures sont réalisées sur mitochondries isolées, suggérant que l'environnement intracellulaire et les interactions des mitochondries avec le réseau cytosquelettique et les autres organites (tels que les myofilaments et le réticulum sarcoplasmique préservés dans le contexte *in situ* mais non *in vitro*), participent à la barrière de diffusion pour l'ADP. Un facteur de nature protéique (facteur X) pourrait être impliqué dans la régulation de la perméabilité de cette membrane en interagissant avec la porine, limitant ainsi le transport de l'ADP vers l'espace intermembranaire (Saks *et al.*, 1995).

D'autres protéines, telles la desmine et la dystrophine, semblent aussi exercer un rôle régulateur sur la fonction mitochondriale des muscles oxydatifs (Kay *et al.*, 1997). Cette barrière de diffusion à l'ADP n'est trouvée que dans les muscles oxydatifs et est inexistante dans les muscles de type glycolytique (Veksler *et al.*, 1995). L'ADP pourrait donc participer à la régulation de la PHOSPHOX par une simple augmentation de sa concentration cytosolique dans les muscles glycolytiques, ce qui n'est pas le cas dans les muscles oxydatifs, où l'entrée et la sortie de l'ADP et l'ATP sont plus finement régulées. Il y a donc une spécificité

mitochondriale de la régulation de la PHOSPHOX liée au tissu. Dans les muscles glycolytiques, la PHOSPHOX est directement stimulée par l'augmentation de la concentration en ADP alors que dans les muscles oxydatifs, elle est dépendante du couplage avec la mi-CK qui va permettre son activation. Il est cependant à noter que l'efficacité de la synthèse de l'ATP mitochondriale peut être modifiée, induisant en retour une modification de la consommation d'oxygène du corps entier. En effet, plus de 90% de la consommation d'oxygène de repos est localisée au niveau mitochondrial, dont environ 80% couplée à la synthèse d'ATP et 20% perdue sous forme de chaleur (Rolfe & Brown, 1997). Cependant ce rapport ATP/O₂ (efficacité de la phosphorylation oxydative) n'est pas constant. Par conséquent, pour une demande en énergie (ATP) donnée, la consommation d'oxygène correspondante sera diminuée si l'efficacité de la phosphorylation est améliorée. A l'inverse, la consommation d'oxygène sera augmentée si le rapport ATP/O₂ est diminué. Il est de plus envisageable que ces modifications se déroulent entre autres dans le foie et les muscles squelettiques, qui participent pour 50% au métabolisme de base (Rolfe & Brown, 1997).

En résumé, la production, le transport et l'utilisation de l'énergie sont des processus fondamentaux qui sont facilités par des voies métaboliques impliquant de multiples réactions enzymatiques qui sont finement régulées. La capacité aérobie d'un muscle est directement dépendante de la capacité à produire de l'énergie lors du processus de la phosphorylation oxydative qui se déroule à l'intérieur de la mitochondrie. La mitochondrie est une organelle composée d'une multitude de complexes protéiques qui sont tous finement régulés en fonction des besoins et des conditions du milieu cellulaire. La mitochondrie joue un rôle clé dans l'homéostasie cellulaire, non seulement par sa fonction de production d'énergie, mais aussi par son implication dans les processus de mort cellulaire et d'interactions fonctionnelles qu'elle établit avec les différentes structures intracellulaires telles que le cytosquelette, les myofilaments, la membrane plasmique et le réticulum sarcoplasmique.

Il reste à présent à comprendre comment la voie de signalisation peut se faire entre les sites d'utilisation de l'énergie et le site de production qu'est la mitochondrie. Il est connu depuis quelque temps qu'il existe des systèmes permettant d'optimiser l'efficacité de la production, du transfert et de l'utilisation de l'ATP évitant une large fluctuation des concentrations en substrats et en produits (ATP, ADP, P_{cr}).

1.2.2. Notion de couplage et de découplage mitochondrial

Nous avons vu dans les parties précédentes qu'il existe un lien étroit entre l'oxydation des coenzymes et la production d'ATP par la mitochondrie appelée couplage (voir figure 11.1). Ce couplage apparaît au niveau du complexe IV: l'envoi de protons dans l'espace intermembranaire induit une différence de concentration en protons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie: c'est le gradient électrochimique ou gradient de protons (voir figure 11), indispensable au fonctionnement de la mitochondrie. La concentration en proton étant donc plus élevée dans l'espace intermembranaire, ces protons vont chercher à réintégrer la matrice sous l'influence de ce gradient, via un complexe enzymatique l'ATP synthase (voir figure 11.2). En conséquence, cette entrée de protons dans ce complexe va amener l'énergie nécessaire pour former de l'ATP à partir d'ADP et de Phosphate inorganique, de l'ATP. Le rapport ATP/O₂, témoin de l'efficacité de la synthèse d'ATP, varie par modification de la force protonmotrice et/ou par modification de l'efficacité de pompage des protons. En effet, les protons de l'espace intermembranaire peuvent également chercher à réintégrer la matrice sans passer par l'ATP synthase et donc sans transformation de l'ADP en ATP.

Ce phénomène est responsable d'un découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Certaines protéines ou agents toxiques peuvent agir au niveau des mitochondries en provoquant un découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Ces molécules agissent en transportant les protons à travers la membrane interne, par une autre voie que l'ATP synthase (voir figure 11.3), ce qui conduit à une augmentation rapide de la consommation d'oxygène en parallèle à une faible formation d'ATP (découplage). De ce fait, l'énergie du gradient de protons est dissipée essentiellement en chaleur du fait de l'activation des nombreuses réactions enzymatiques. Les cellules compensent la baisse du rendement de production de l'ATP en oxydant davantage les réserves stockées sous forme de glucides et de lipides. Ceci a pour conséquence d'activer le métabolisme de base de l'organisme et donc d'augmenter la consommation des substrats (et donc d'augmenter la dépense énergétique) ainsi que la production de chaleur. Ce phénomène de découplage est retrouvé dans la graisse brune où les mitochondries des adipocytes sont découplées du fait de l'expression importante de la protéine découplante UCP1.

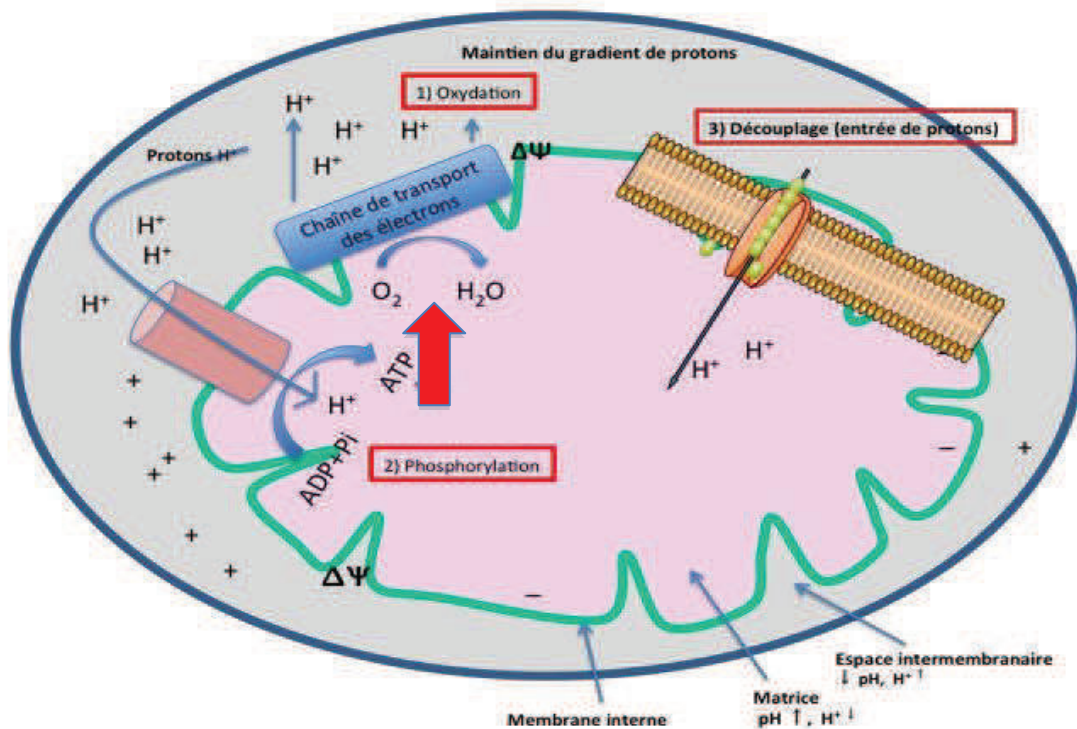


Figure 11. Schéma du couplage/découplage de la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie. 1) Oxydation des différents substrats énergétiques au niveau de la chaîne de transport des électrons 2) La concentration en proton étant plus élevée dans l'espace intermembranaire, les protons vont chercher à intégrer la matrice selon le gradient de concentration, *via* le complexe enzymatique l'ATP synthase. En conséquence, cette entrée de protons dans ce complexe va amener l'énergie nécessaire pour former à partir d'ADP et de Phosphate inorganique, de l'ATP (phosphorylation). 3) Certains protéines ou agents toxiques vont agir au niveau des mitochondries en provoquant un découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale, en transportant les protons à travers la membrane interne, ailleurs que par l'ATP synthase de cet organite.

1.2.2.1. Le découplage mitochondrial

Dans certaines conditions, on constate une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et donc une diminution du gradient de protons à travers cette membrane. La fuite de protons à l'origine de ce découplage extrinsèque peut être basale, c'est-à-dire influencée par les propriétés physicochimiques de la membrane, ou inductible. Dans ce dernier cas, elle dépend alors de la présence de facteurs particuliers (protéines découplantes ou acides gras notamment).

La fuite basale de protons (proton leak)

Dans les mitochondries fonctionnelles, la respiration et la synthèse d'ATP sont couplées par la force liée au gradient de concentration des protons. Cependant, ce couplage n'est pas parfait et une partie des protons pompés retourne dans la matrice par simple diffusion au travers de la membrane interne et ne sert donc pas pour la phosphorylation de l'ADP. L'intensité de cette fuite est variable et les mécanismes à l'origine de cette perméabilité partielle de la membrane interne mitochondriale ne sont pas entièrement élucidés. La composition en acides gras de la membrane semble aussi jouer un rôle dans la fuite de protons. En effet, (Bobyleva *et al.*, 1997) ont démontré que l'intensité de la fuite de protons est proportionnelle à la quantité de cardiolipines. De plus, Pehowich (Pehowich, 1999) a montré que la composition des phospholipides, notamment leur teneur en acides gras de la famille n-6 et n-3, influençait la perméabilité membranaire (plus le rapport n-6/n-3 est haut, plus la fuite de protons est élevée). Cette fuite de protons basale est importante physiologiquement puisqu'elle serait responsable de 33% de la respiration basale dans les hépatocytes (Brand *et al.*, 1994) et représenterait environ 20% du métabolisme de base chez le rat (Rolfe & Brown, 1997).

Il y a également certaines protéines qui jouent un rôle dans ce découplage. Ainsi, Brand *et al.* (Brand *et al.*, 2005) ont montré que des souris, chez lesquelles le gène codant pour l'isoforme 1 de l'ANT a été inactivé, présentent une conductance membranaire mitochondriale diminuée de 50% dans le muscle. Ils ont montré également que la surexpression de l'ANT dans les mitochondries de drosophile augmente la perméabilité membranaire aux protons. De même, Shabalina *et al.* (Shabalina *et al.*, 2006) ont montré que l'ANT participait pour une large proportion à la fuite basale dans les mitochondries du tissu adipeux brun et proposent un modèle selon lequel l'ANT1 est responsable de cette fuite basale et que l'ANT2 est plutôt impliquée dans la partie de la fuite induite par les acides gras qui est dépendante de l'ANT. Le transporteur glutamate/aspartate pourrait également intervenir dans la fuite inductible par les acides gras en transportant ces derniers (Wojtczak & Wieckowski, 1999).

1.2.2.2. Les protéines découplantes

En dehors de la fuite basale, certaines protéines sont également capable de découpler la phosphorylation oxydative mitochondriale. Depuis la fin des années 1980, une protéine

découplante avec 3 isoformes a été identifiée : l' UCPs (Uncoupling Proteins) (Ricquier & Bouillaud, 2000; Blanc *et al.*, 2003) : La première isoforme, l'UCP-1 a été isolée du tissu brun où elle joue un rôle thermogénique en réponse aux stimulations bêta-adrénergiques (Ricquier & Bouillaud, 2000). L'activité découplante d'UCP1 est expliquée par sa capacité à transporter des protons surtout lorsque des molécules d'acides gras se lient à cette protéine. L'activité catalytique de cette protéine n'est pas encore clairement élucidée puisque certains auteurs pensent qu'il s'agit réellement d'un transporteur de protons activé par les acides gras, alors que d'autres suggèrent qu'elle permet le retour des acides gras vers l'espace intermembranaire sous forme anionique, alors qu'ils ont traversé la membrane sous forme protonée, pour atteindre la matrice mitochondriale (mécanisme de flip flop). Les isoformes UCP2 à UCP5 ont ensuite été identifiées dans différents tissus sur la base de leur homologies de séquence avec la protéine UCP1 (UCP2; UCP3; UCP4; UCP5). Une activité de transport de protons a également été identifiée pour les protéines UCP2 et UCP3, plus largement distribuées que les UCP-1 (Pecqueur *et al.*, 2001b) et leur expression dans des cellules de mammifères permet un découplage. Cependant, il semblerait que les UCP-2 et -3 ont un rôle prédominant dans la limitation de la production de radicaux libres de l'oxygène (RLO) par la chaîne respiratoire (cf paragraphe IIB.1).

1.2.2.3. Les découplants pharmacologiques (DNP, CCCP et FCCP)

En plus des protéines découplantes, d'autres molécules avec des propriétés découplantes (découplage artificiel par des découplants chimiques) ont été découvertes. Ce sont pour la plupart des transporteurs lipophiles de protons. Le composé souvent cité est le 2,4-dinitrophénol. C'est celui que nous avons utilisé dans l'une de nos études. C'est un composé chimique aromatique de formule $C_6H_4N_2O_5$. C'est l'un des six isomères du dinitrophénol. Il diffuse à travers la membrane mitochondriale interne et peut ainsi transporter des protons d'un lieu à un autre. Par ce fait, il annule le gradient de concentration de protons associé au transport des électrons. Les découplants inhibent la phosphorylation sans perturber le transport des électrons. L'énergie libre fournie par le transport des électrons est, dans ce cas, entièrement dissipée sous forme de chaleur. D'autres molécules, comme par exemple, les dérivés phénylhydrazone tels que le CCCP (carbonylcyanide-m-chlorophénylhydrazone) ou le FCCP (carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone) sont également de puissants découplants capables d'agir à des concentrations beaucoup plus faibles que le DNP. Ce sont

les composés les plus classiquement utilisés pour dissiper, de manière expérimentale, le gradient de protons.

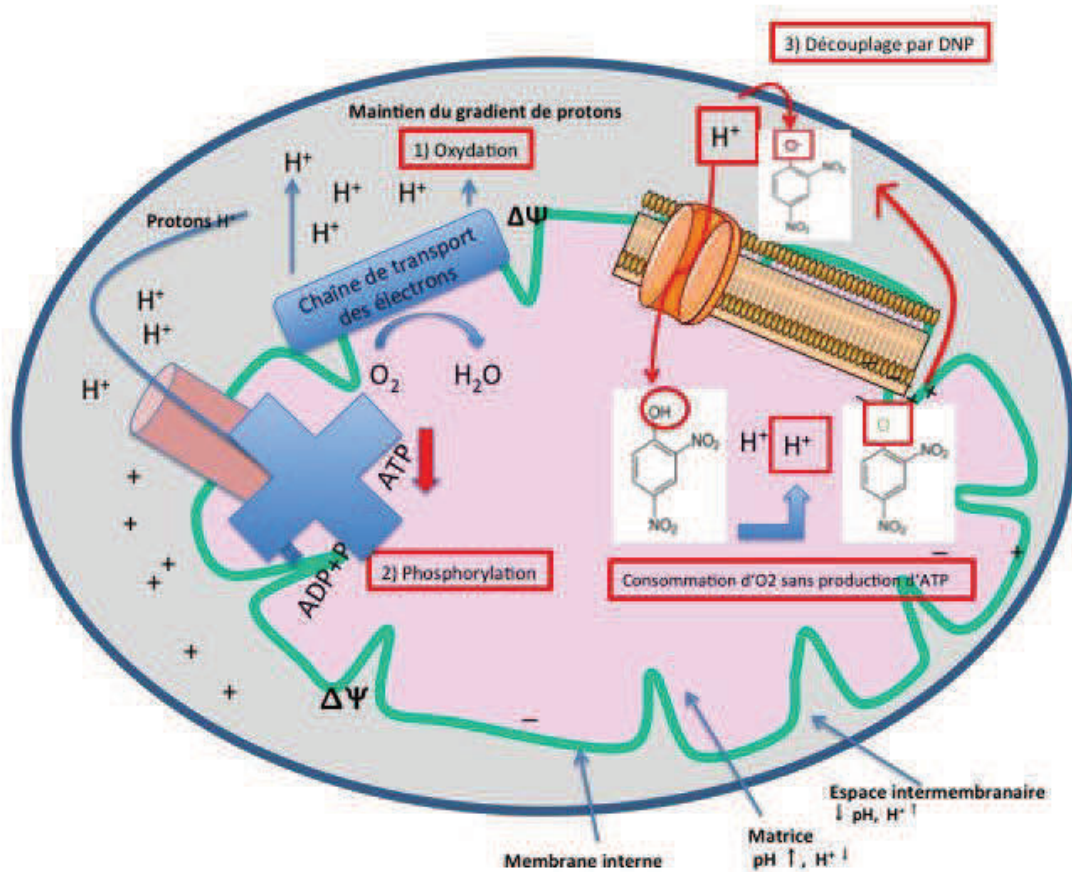


Figure 12. Schéma du découplage de la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie. Idem que 1) et 2) sur la figure 11 en ajoutant l'étape du découplage. 3) Le DNP provoque un découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale, en transportant les protons à travers la membrane interne, ailleurs que par l'ATP synthase de cet organelle, ce qui conduit à une augmentation rapide de la consommation d'oxygène en parallèle d'une faible formation d'ATP (découplage). Pour ce faire, la molécule chargée négativement est transloquée au niveau de l'espace intermembranaire (chargé moins négativement que la matrice) où elle capte un proton. Le découplant protoné retourne alors dans la matrice où il relargue son ion H^+ . Le gradient électrochimique créé par la chaîne respiratoire est ainsi dissipé et ne sert pas à l'ATP synthase pour la phosphorylation de l'ADP. Il en résulte donc un découplage entre les oxydations et la production d'ATP

Tous ces découplants sont en fait des acides organiques faibles avec une charge négative délocalisée, ce qui leur confère une forte hydrophobicité. Cette charge leur permet de traverser plus facilement les membranes biologiques. La molécule chargée négativement est transloquée au niveau de l'espace intermembranaire (chargé moins négativement que la matrice) où elle capte un proton (voir figure 12). Le découplant protoné retourne alors dans la

matrice où il relargue son ion H^+ . Le gradient électrochimique créé par la chaîne respiratoire est ainsi dissipé et ne sert pas à l'ATP synthase pour la phosphorylation de l'ADP. Il en résulte donc un découplage entre les oxydations et la production d'ATP (Kadenbach, 2003), avec une consommation d'oxygène continue, mais sans production d'ATP.

De même, certains antibiotiques, utilisés comme ionophores (tels que la valinomycine et l'ionomycine), sont capables de dissiper le gradient de protons au niveau de la membrane interne mitochondriale.

En résumé, l'efficacité de la synthèse d'ATP au niveau mitochondrial est définie par la quantité d'ATP produite par molécule d'oxygène consommée (rapport ATP/O₂). Ce paramètre varie soit par modification de la force liée au gradient de concentration des protons et/ou par modification de l'efficacité de pompage des protons. En effet, certaines protéines ou agents toxiques vont agir au niveau des mitochondries en provoquant un découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale, transportant les protons à travers la membrane interne, par une autre voie que l'ATP synthase, ce qui conduit à une augmentation rapide de la consommation d'oxygène en parallèle à une faible formation d'ATP (découplage). Dans notre principale étude, nous avons utilisé un agent découplant chimique, le DNP, qui induit une augmentation du métabolisme de base du fait de la diminution de l'efficacité de synthèse de l'ATP. L'effet d'un découplage mitochondrial et donc d'une baisse du rendement mitochondrial sur les adaptations métabolique du muscle squelettique demeurent mal connu.

2. LE STRESS OXYDANT

Les organismes multicellulaires possèdent tous des réseaux complexes de signalisation intra et extracellulaire qui contrôlent et harmonisent les fonctions cellulaires dans les différents processus physiologiques tels que l'organogénèse, l'intégrité et l'homéostasie tissulaire, et la réponse aux événements pathologiques.

Les radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO) ou espèces réactives oxygénées, produits par les cellules, ont été traditionnellement considérés comme des produits toxiques du métabolisme. Le stress oxydant intracellulaire peut être défini comme un déséquilibre de la

balance entre la production de RLO d'un côté et leur élimination de l'autre. La capacité à éliminer les RLO est appelée « capacité anti-oxydante » de la cellule, et permet d'empêcher les lésions oxydatives. Une surproduction de RLO ou un déficit en systèmes protecteurs antioxydants sont d'ailleurs fortement impliqués dans les mécanismes physiopathologiques de nombreuses maladies tels que le diabète, la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson.

2.1. Différentes formes de radicaux libres et dégâts cellulaires

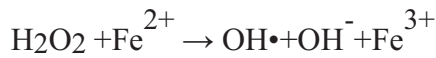
Un radical libre est une espèce chimique contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013).

L'O₂ est une molécule biradicalaire formée de deux atomes d'oxygène présentant sur leurs orbites externes deux électrons non appariés. L'O₂ est donc susceptible de capter facilement un puis deux électrons pour être partiellement réduit en anion superoxyde (O₂•⁻) puis en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Il est ainsi à l'origine de la formation des radicaux libres dérivés de l'oxygène.

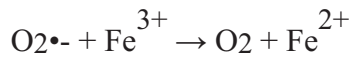
Les RLO comportent les radicaux libres dérivés de l'oxygène : l'anion superoxyde (O₂•⁻), le radical hydroxyle (OH•), et aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est aussi importante, tel que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

L'anion superoxyde (O₂•⁻) est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte alors un électron. La dismutation de cet O₂•⁻ entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'H₂O₂ n'est pas un radical libre au sens propre, mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques et sa demi-vie font qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production. Selon la

réaction de Fenton, l'H₂O₂ se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe²⁺), en un ion OH⁻ et un radical hydroxyle (OH•) :



Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde (O₂•-) qui régénère le Fe³⁺ en Fe²⁺ selon la réaction d'Haber- Weiss :



Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), d'anion superoxyde (O₂•-) et de fer permet la production de radical hydroxyle (OH•). L'OH•, avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...), entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L'OH• apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des RLO.

2.2. Le découplage mitochondriale et la production de RLO

Concernant les protéines découplantes, les souris déficientes en gènes codant UCP-2 et en UCP-3 surproduisent des RLO par rapport aux souris contrôles (Arsenijevic *et al.*, 2000). De plus, la déficience en UCP-2 entraîne une hypersécrétion d'insuline (Blanc *et al.*, 2003). Plusieurs auteurs ont démontré que les UCP pourraient répondre à une augmentation de la production matricielle d'ions superoxydes en induisant un découplage modéré (« mild uncoupling ») dans ces cellules (Murphy *et al.*, 2003; Talbot *et al.*, 2004). Il a ainsi été démontré que les UCPs ne contrôlaient pas seulement la production des RLO, mais étaient également la cible de ces dernières (Echtay *et al.*, 2002). Ainsi, les auteurs démontrent que les anions superoxydes sont capables d'activer les protéines UCP1, 2 et 3 par un mécanisme dépendant des acides gras. De plus, quand le potentiel de membrane mitochondrial est élevé, suite à une augmentation de la force électrochimique liée aux protons, la production d'ions superoxyde augmente (Turrens, 1997), la dissipation du gradient pourrait donc servir à diminuer la production de ces RLO. En effet, la production des RLO est contrôlée par le potentiel membranaire mitochondrial qui, lorsqu'il est élevé, accroît la demi-vie du radical ubi-semiquinone, producteur d'ion superoxyde. Si les protons peuvent rentrer dans la matrice via l'ATPase ou par une autre voie, le potentiel transmembranaire diminue et la production

d'ions superoxyde est diminuée. Une protéine de type UCP pourrait donc constituer cette autre voie indépendante de la phosphorylation de l'ADP. Le concept de découplage modéré a été émis par Skulachev (1996) (pour revue (Starkov, 1997) et suggère que ce dernier peut induire une augmentation assez faible de la conductance de la membrane interne mitochondriale aux protons, ce qui aurait pour effet de diminuer légèrement le potentiel de membrane et donc de diminuer la production de RLO. *In vitro*, il a été démontré qu'un découplage respiratoire modéré diminue la production mitochondriale des RLO et, qu'à l'inverse, on observe une augmentation des RLO lors de l'inhibition d'une UCP dans des mitochondries isolées (Nègre-Salvayre *et al.*, 1997). Une autre cible des UCPs serait les acides gras qui, comme les RLO, participeraient à l'activité découplante de ces protéines (Garlid *et al.*, 1998). Dès 1997, un effet régulateur de UCP-2 sur la production mitochondriale de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (effet ralentisseur) avait été observé par Negre-Salvayre *et al.* (Nègre-Salvayre *et al.*, 1997). UCP-2 et -3 semblent donc jouer un rôle prédominant dans la production des RLO, en inhibant celle-ci.

Une étude publiée par Echtay *et al.* (Echtay *et al.*, 2002) décrit une régulation commune aux trois UCP. Ces auteurs proposent que l'activité de découplage de la respiration (inhibée par le GDP et activée par les acides gras libres comme cela était connu pour UCP1) de ces trois transporteurs ne s'exerce que si l'ion superoxyde est présent. L'intérêt de leur travail était d'unifier les relations entre niveau de couplage de la respiration et production de RLO : ce serait l'activation des UCP par les RLO eux-mêmes (en fait l'ion superoxyde spécifiquement) qui provoquerait un découplage respiratoire diminuant la production de RLO. À cette boucle de régulation immédiate de la production de RLO s'ajouterait une induction de l'expression des UCP (UCP2) dans les conditions où la synthèse des RLO est accrue (Pecqueur *et al.*, 2001a).

En résumé, des protéines identiques à certaines UCP de mammifères existent dans de nombreuses espèces animales ancestrales et chez les plantes. Il est donc possible que les UCP représentent un système archaïque d'adaptation à la vie aérobie et à la production de radicaux libres oxygénés. Plusieurs auteurs démontrent que lorsque le potentiel de membrane mitochondrial est élevé, suite à une augmentation de la force électrochimique du gradient de protons (découplage), la production d'ions superoxyde augmente et la dissipation du gradient pourrait donc servir à diminuer la production de ces RLO. Les

anions superoxydes sont capables d'activer les protéines UCP1, 2 et 3 qui à leur tour vont diminuer la production de RLO.

2.3. Sources cellulaires des RLO

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

2.3.1. La xanthine oxydase

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

2.3.2. La NADPH oxydase

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

2.3.3. Le réticulum endoplasmique

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

2.3.4. Les peroxysomes

Les peroxysomes (corps de peroxyde) sont des sacs membraneux (vésicules) qui contiennent diverses enzymes puissantes, dont les plus importantes sont les oxydases et les catalases. Les peroxysomes sont une importante source de production d' H_2O_2 cellulaire (Boveris *et al.*, 1972). Les oxydases utilisent l'oxygène moléculaire (O_2) pour détoxifier des substances nocives, dont l'alcool et le formaldéhyde. La fonction la plus importante des peroxysomes est le désamorçage des radicaux libres dangereux. Les oxydases convertissent les radicaux libres en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui est aussi une substance réactive et dangereuse mais qui est rapidement transformée en eau par d'autres enzymes, les catalases. Les radicaux libres et le peroxyde d'hydrogène sont des sous-produits normaux du métabolisme cellulaire, mais ont des effets désastreux sur les cellules s'ils s'accumulent. Les peroxydes sont particulièrement nombreux dans les cellules du foie et des reins où ils contribuent très activement à la détoxification. On peut juger de leur importance par les conséquences de leur absence par suite d'une anomalie génétique : celle-ci entraîne en effet la mort en bas âge.

2.3.5. La mitochondrie

La principale source de RLO est la mitochondrie au niveau de sa chaîne respiratoire, qui produirait en effet 90% des RLO cellulaires (Balaban *et al.*, 2005), de manière permanente. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisée par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des RLO (Boveris & Chance, 1973). Mais ces estimations sont réalisées à partir de mesure *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et d'une concentration saturante en substrats. Il est vraisemblable que la production mitochondriale de RLO *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,4 à 0,8%) (Hansford *et al.*, 1997). Il existe deux principaux sites de production de RLO : les complexes I et III (voir [figure 13](#)).

Le complexe III a longtemps été considéré comme le plus important site de production d' $O_2\bullet-$ et le complexe I comme un acteur secondaire. Cependant, ces premières études utilisaient comme substrat respiratoire du succinate (fournisseur de $FADH_2$), combiné à de la roténone (inhibiteur du complexe I). Or, en ajoutant successivement le succinate puis la roténone, des mesures ont permis de mettre en évidence l'existence d'un flux inverse

d'électrons. Ce flux d'électrons issus de l'oxydation du FADH₂ remonte du complexe II vers le complexe I atteignant ainsi le site de production de RLO du complexe I. Il a alors été clairement défini que la source majeure de RLO était le complexe I via ce flux inverse d'électrons (Hansford *et al.*, 1997). Ce flux d'électrons entraîne également la réduction du NAD⁺ en NADH.

Ceci implique que la production de RLO est directement dépendante des équivalents réduits fournis aux mitochondries. La quantité d'H₂O₂ produite en présence de substrat fournissant du FADH₂ au complexe II (succinate, flux inverse d'e⁻) est en effet plus importante qu'avec des substrats fournissant du NADH, H⁺ au complexe I (glutamate/malate ou pyruvate/malate, flux normal d'e⁻). Concernant la production de RLO liée au flux normal d'électrons, elle est plus élevée avec du glutamate/malate qu'avec du pyruvate/malate bien que ces deux substrats fournissent du NADH, H⁺. Cette différence pourrait s'expliquer par les propriétés anti-oxydantes du pyruvate.

A ce jour, le site exact de la production de RLO du complexe I reste encore controversé.

Trois hypothèses sont émises : cette production pourrait avoir lieu au niveau :

- 1°) des quinones (Q)
- 2°) du groupe des flavines mononucléotides (FMN) (Liu *et al.*, 2002)
- 3°) du groupe fer-soufre [Fe/S] (Genova *et al.*, 2001)

Comme ces trois structures sont très proches les unes des autres et interagissent les unes avec les autres (Herrero & Barja, 2000), il est difficile de dire laquelle intervient spécifiquement dans la production de RLO.

La production de RLO au niveau du complexe III, quant à elle, résulte de la réduction partielle de l'ubiquinone. L'électron libre provenant du transfert à travers la chaîne respiratoire s'apparie avec l'ubiquinone (Ub) formant le radical semi-ubiquinone (UbH•) qui est instable. Un deuxième électron est donc nécessaire pour le stabiliser et permettre le transfert de proton grâce à l'intermédiaire ubiquinol (UbH₂). Toutefois, il existe une probabilité pour que le radical semi-ubiquinone rencontre une molécule d'oxygène avant d'être stabilisé par le deuxième électron. La molécule d'oxygène va alors capter l'électron libre générant ainsi un anion superoxyde (Turrens *et al.*, 1985).

La production de RLO au niveau du complexe I a lieu uniquement dans la matrice alors que la production au niveau du complexe III a lieu dans l'espace matriciel ainsi que dans l'espace inter-membranaire. L' $O_2^{\bullet-}$ généré dans la matrice est éliminé dans ce compartiment par la superoxyde dismutase mitochondriale (Mn-SOD), l' H_2O_2 alors produit peut diffuser rapidement à travers la membrane jusqu'au cytoplasme. L' $O_2^{\bullet-}$ produit dans l'espace inter-membranaire est soit :

- 1°) transformé par l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase cytoplasmique (Cu/Zn-SOD)
- 2°) détoxifié par le cytochrome c
- 3°) transféré dans le cytoplasme via un canal voltage-dépendant VDAC. L' $O_2^{\bullet-}$ est alors pris en charge par la Cu/Zn-SOD (Han *et al.*, 2003).

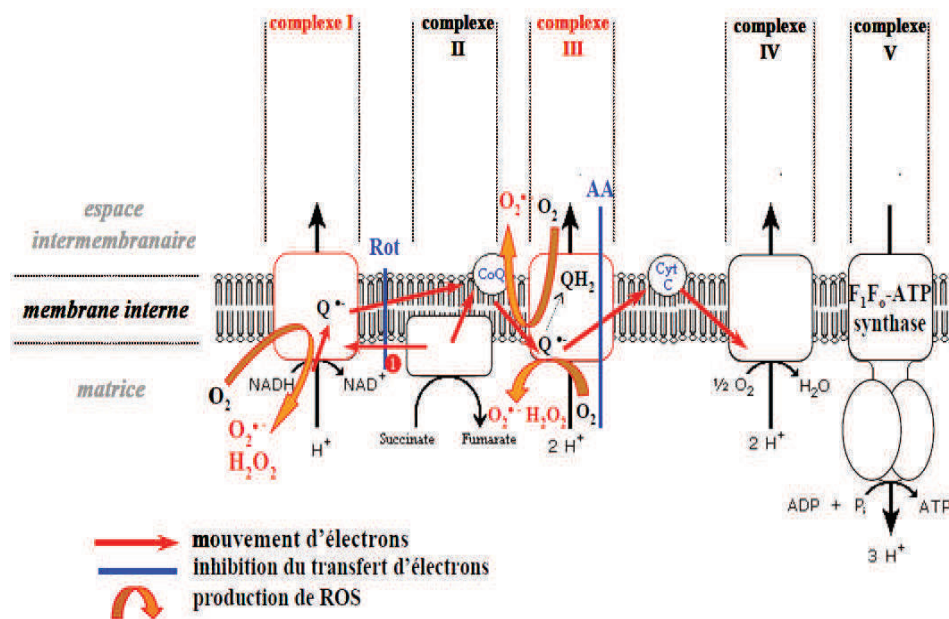


Figure 13 : Sites de production de RLO au niveau de la chaîne respiratoire. Adapté de <http://biophile.free.fr>. Deux sites de production d' $O_2^{\bullet-}$ sont reconnus : le complexe I et le complexe III. L'utilisation de la roténone (Rot) et de l'antimycine A (AA) a permis de localiser la production de RLO au niveau de ces complexes et de mettre en évidence le flux inverse d'électrons remontant du complexe II au complexe I.

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

Puisque la consommation basale d'oxygène est associée à un potentiel de membrane élevé et donc à un état plus réduit des transporteurs d'électrons, la production de RLO dans ces conditions est la plus importante. Par contre, elle est drastiquement diminuée en condition d'oxydation phosphorylante (après ajout d'ADP). En effet, la présence d'ADP, stimulant la respiration, augmente l'oxydation des transporteurs d'électrons et ainsi diminue fortement le flux d'électrons s'échappant de la chaîne respiratoire pour réduire l'O₂ en O₂^{•-} (Boveris & Chance, 1973; Herrero & Barja, 2000).

Néanmoins, la corrélation entre le potentiel de membrane et la production de RLO est à nuancer. La production de RLO liée à l'oxydation du NADH, H⁺ au niveau du complexe I ainsi que celle générée au niveau du complexe III sont peu sensibles aux variations du $\Delta\psi$. Starkov & Fiskum en 2003 confirment ces données en observant une quantité significative d'H₂O₂ produite en présence de substrats fournissant du NADH, H⁺ même en absence de $\Delta\psi$ (30% de la valeur obtenue en $\Delta\psi$ maximal) (Starkov & Fiskum, 2003). Ainsi, seul le flux inverse d'électrons est réellement sensible au $\Delta\psi$; une légère dépolarisation étant suffisante pour inhiber complètement la production de RLO par cette voie (Votyakova & Reynolds, 2001). Il existe donc deux mécanismes dans la production de RLO : un mécanisme dépendant du potentiel de membrane de la mitochondrie et un mécanisme indépendant de ce potentiel.

2.4. Système de défense antioxydant

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de RLO est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une

augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Powers & Hamilton, 1999).

2.4.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les RLO (Figure 14).

➤ **Superoxyde dismutase (SOD)**

Cette enzyme catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD ou SOD1), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD ou SOD2) et une forme extracellulaire (EC-SOD ou SOD3). Il a été montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter-membranaire (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001). La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouvent dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries. Cependant, la Mn-SOD semble indispensable à la vie puisque sa mutation est non viable ; l'espérance de vie maximale pour des souris Mn-SOD^{-/-} n'est que de 22 jours pour certains types de mutations (Huang *et al.*, 2001). Ceci n'est pas le cas pour la forme cytosolique bien que l'espérance de vie chez des souris transgéniques Cu/Zn-SOD^{-/-} soit plus faible que celle de souris Cu/Zn-SOD^{+/+} (130 semaines vs 180 semaines) (Sentman *et al.*, 2006).

➤ **Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR)**

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

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

➤ **Catalase**

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

2.4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, le glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C (Figure 14).

➤ **Oligoéléments**

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

➤ **Glutathion**

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

d'H₂O₂ est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji *et al.*, 1991).

➤ **Ubiquinones et cytochrome c**

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de RLO. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant. L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxylys. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les RLO (Podda *et al.*, 1996).

Le cytochrome c présent dans l'espace inter-membranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d'O₂•- produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l'H₂O (Skulachev, 1998).

➤ **Vitamine E et vitamine C**

Les vitamines C (acide ascorbique) et E (α -tocophérol) sont des anti-oxydants qui neutralisent les radicaux libres susceptibles d'être nocifs et toxiques pour les tissus. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique.

La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l'O₂•- et l'OH•. Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E.

En résumé, la vitamine E interagit avec les radicaux libres pour les ramener à un état moins toxique : celle-ci se trouve elle-même transformée en radical libre, qui est à son tour inactivée par les caroténoïdes (bases de la vit A). Les radicaux de caroténoïdes ainsi produits sont inactivés par la vitamine C, et les radicaux hydrosolubles formés pendant cette réaction sont évacués de l'organisme dans l'urine. A l'heure actuelle, les scientifiques ne sont pas tout à fait d'accord sur l'effet bénéfique d'une supplémentation en antioxydants tels que les vitamines par exemple.

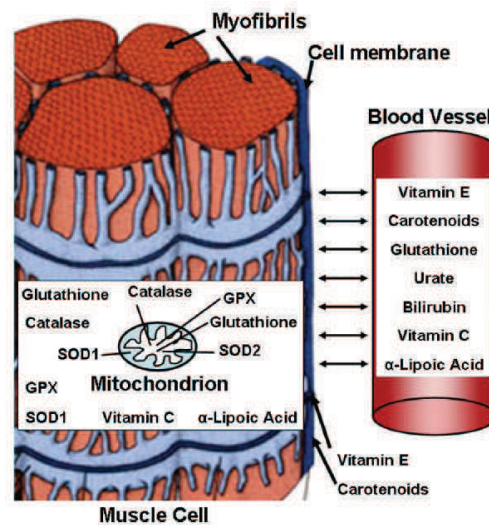


Figure 14 : Localisation des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans la cellule musculaire. GP_x, glutathione peroxidase; SOD1, superoxide dismutase 1; SOD2, superoxide dismutase 2. (Tiré de l'article de (Powers et al., 2008).

2.4.3. Supplémentation en antioxydants

Selon Kanter (1995), les individus consommant quotidiennement un mélange de vitamines anti-oxydantes composées de β-carotène, d'acide ascorbique et de vitamine E présentent, tant au repos qu'à la suite d'un exercice, une quantité de marqueurs sériques et respiratoires de la peroxydation des lipides plus faible que celle mesurée chez des sujets n'ayant reçu aucune supplémentation. De même, une supplémentation de vitamine E réduirait de façon drastique la production de radicaux libres (diminution du pentane, principal marqueur de la production de RLO). Cependant, chez le sportif dont l'alimentation est équilibrée, rien n'oblige à prendre des compléments de vitamines anti-oxydantes comme moyen préventif de défense contre un excès de radicaux libres (Kanter, 1995). Toutefois, chez les coureurs cyclistes de compétition, une supplémentation en Vitamine E pendant 5 mois a eu un effet protecteur sur les marqueurs du stress oxydatif induit par l'endurance extrême. Les auteurs ne sont effectivement pas encore en harmonie concernant l'effet d'une supplémentation en anti-oxydants. Cependant, il a été démontré, chez le rat, qu'une carence en vitamine E, altère la fonction mitochondriale.

D'un autre côté, selon Bjelakovic et al. (Bjelakovic *et al.*, 2012), la prise d'antioxydants au mieux n'apporte aucun bénéfice et au pire augmente légèrement la mortalité chez l'homme (+4%). L'augmentation de la mortalité était associée à la bêta carotène, et potentiellement à la vitamine A et la vitamine E mais pas avec le sélénium ou la vitamine C. Par ailleurs, très récemment, Sayin et al. ont démontré que les compléments de vitamines antioxydantes accélèrent le développement de lésions précancéreuses ou de cancers précoces du poumon chez des souris et des cellules humaines en laboratoire, élucidant pour la première fois ce mécanisme. (Sayin *et al.*, 2014).

2.4.4. Carences en anti-oydants

En effet, chez le rat carencé en vitamine E, Lee (2002) a constaté que l'exercice augmente la production de radicaux libres musculaires et hépatiques (Lee *et al.*, 2002). Ainsi, cette défiance vitaminique augmente la peroxydation lipidique et diminue l'activité de plusieurs enzymes mitochondriales lors d'un exercice exhaustif.

2.5. Dégats cellulaires

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

2.5.1. Peroxydation lipidique

Les premières cibles des RLO sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbituriques (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont étudiés comme marqueurs de

la peroxydation lipidique. Cependant, le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCPs et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale de RLO (Echtay *et al.*, 2002). Ce mécanisme pourrait être un moyen de réguler la production de RLO.

2.5.2. Dommages de l'ADN

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des RLO. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire. Les mécanismes explicatifs proposés sont :

- 1°) l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial
- 2°) sa localisation proche de la membrane interne,
- 3°) des mécanismes de réparations frustrés
- 4°) une structure circulaire sans introns, augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes.

L'idée d'un "cercle vicieux" ou d'une théorie avec un "*feed-back*" positif est avancée pour expliquer les altérations mitochondriales dans certaines pathologies : des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire pourraient augmenter la production de RLO et induire ainsi une augmentation progressive des mutations du génome mitochondrial et des protéines synthétisées. Comme le génome mitochondrial code pour quelques sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (sept sous-unités du complexe I, une du complexe III, trois du complexe IV et deux de l'ATP synthase), leur défaut d'expression pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au profit de la production de RLO. Ainsi, plus la fuite d'électrons est importante, plus la formation de RLO provoquant de nombreuses mutations mitochondriales aggraverait ce phénomène (Beckman & Ames, 1998).

Les fonctions de la mitochondrie sont donc particulièrement exposées aux dommages oxydatifs provoquant principalement une diminution de la synthèse d'ATP mais engageant également la cellule dans un programme de mort cellulaire par apoptose avec l'induction de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP).

2.6. Le concept de l'hormèse mitochondriale ou mitohormesis

Récemment, notre laboratoire a pu démontrer qu'une augmentation de la production de RLO par les statines a des effets bénéfiques lorsque cette production est modérée, mais a des effets délétères lorsque cette production est trop importante. Ces statines, *via* cette augmentation modérée de RLO, activent la biogenèse mitochondriale dans le cœur (augmentation des niveaux d'expression de PGC-1 α et - β), permettant l'amélioration des capacités antioxydantes musculaires. Nous avons pu le démontrer à la fois chez l'animal et chez l'homme (Bouitbir *et al.*, 2011a). Par contre, dans le muscle squelettique de patients ayant une myopathie aux statines, ces molécules semblent induire un stress oxydant majeur responsable à la fois d'une désactivation transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale ainsi que des dysfonctions mitochondriales. Les résultats de cette étude suggèrent alors que l'activation de l'expression de PGC-1 α peut être déclenchée par la génération de faibles doses de RLO mitochondriaux permettant de contrecarrer ce stress oxydant et de rétablir une homéostasie cellulaire, correspondant ainsi à un phénomène d'hormèse. Ainsi, dans le cas de la mitochondrie, une production de RLO à faible dose pourrait entraîner un effet bénéfique notamment par une activation de la biogenèse mitochondriale et des capacités antioxydantes, alors qu'à forte dose les RLO ont clairement un effet toxique sur les mitochondries (Bouitbir *et al.*, 2011a). C'est la définition de l'hormèse mitochondriale (voir figure 15).

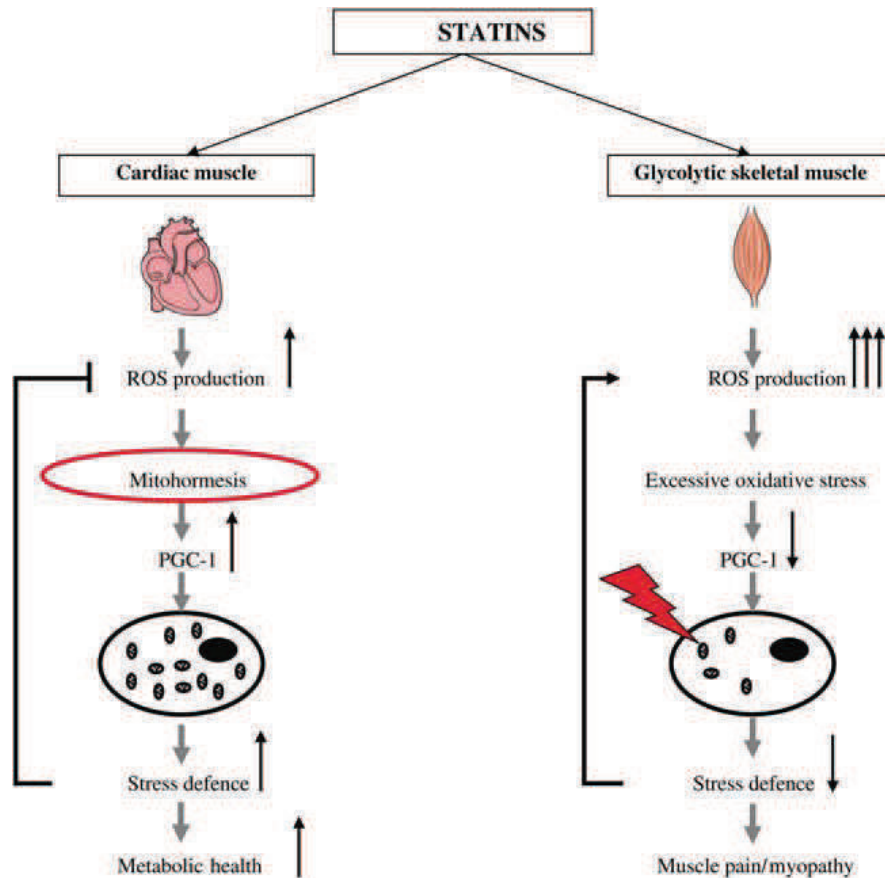


Fig 15: Schéma illustrant l'action des statines sur la fonction mitochondriale selon le phénotype musculaire. Les statines agissent par un "mécanisme de mitohormèse" en protégeant le muscle cardiaque oxydatif, en stimulant la biogenèse mitochondriale par un stress oxydatif modéré. Inversement, lorsque la quantité d'antioxydants n'étaient pas suffisantes pour diminuer les espèces réactives de l'oxygène induites par le stress oxydant élevé dans le muscle squelettique glycolytique, les statines induisent des dysfonctionnements mitochondriaux avec une diminution de la biogenèse mitochondriale et des douleurs musculaires, voire des myopathies.

Très récemment, notre laboratoire a publié une revue mettant en évidence l'hormèse mitochondriale dans l'ischémie-reperfusion (voir figure 16) (Lejay *et al.*, 2014). Cette hormèse peut se définir comme l'activation des propriétés cellulaires protectrices et réparatrices d'un organisme (tissu) soumis à un stress physiologique modéré (Schwartz & Sack, 2008). Le terme hormèse a été proposé pour la première fois par Southam et Ehrlich en 1943 : lors de leurs travaux sur une substance antibiotique extraite du duramen du Thuya géant de Californie. Lors de la mise en présence d'une faible dose de l'antibiotique, ils ont observé une stimulation apparente de la croissance d'organismes, qui, à des concentrations plus élevées, étaient sensibles à cet antibiotique (Randall *et al.*, 1947).

Ainsi, depuis quelques décennies, il était admis que l'augmentation des radicaux libres était le principal responsable du processus du vieillissement et de la diminution de la durée de vie des organismes (Harman, 1956). Durant ces années, un certain nombre d'études se sont efforcées de diminuer le stress oxydant à l'aide de molécules antioxydantes. Cependant, les résultats de ces études furent surprenants. En effet, elles ont démontré que les molécules antioxydantes avaient peu ou pas d'effets, mais surtout que les RLO étaient essentiels à l'activation de voies de signalisation aboutissant à une augmentation de la durée de vie des organismes. Par ailleurs, il a été démontré qu'une supplémentation en molécules antioxydantes inhibe les effets bénéfiques de l'activité physique (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008; Ristow *et al.*, 2009). Par ailleurs, Piantadosi *et al.* ont démontré un lien entre la production de RLO mitochondriaux et la biogenèse mitochondriale (Piantadosi *et al.*, 2008).

Ces différentes études ont permis de mettre à jour un nouveau concept nommé « mitohormesis ». Ce concept nous permet d'avoir un autre regard sur les radicaux libres qui furent longtemps associés à des pathologies.

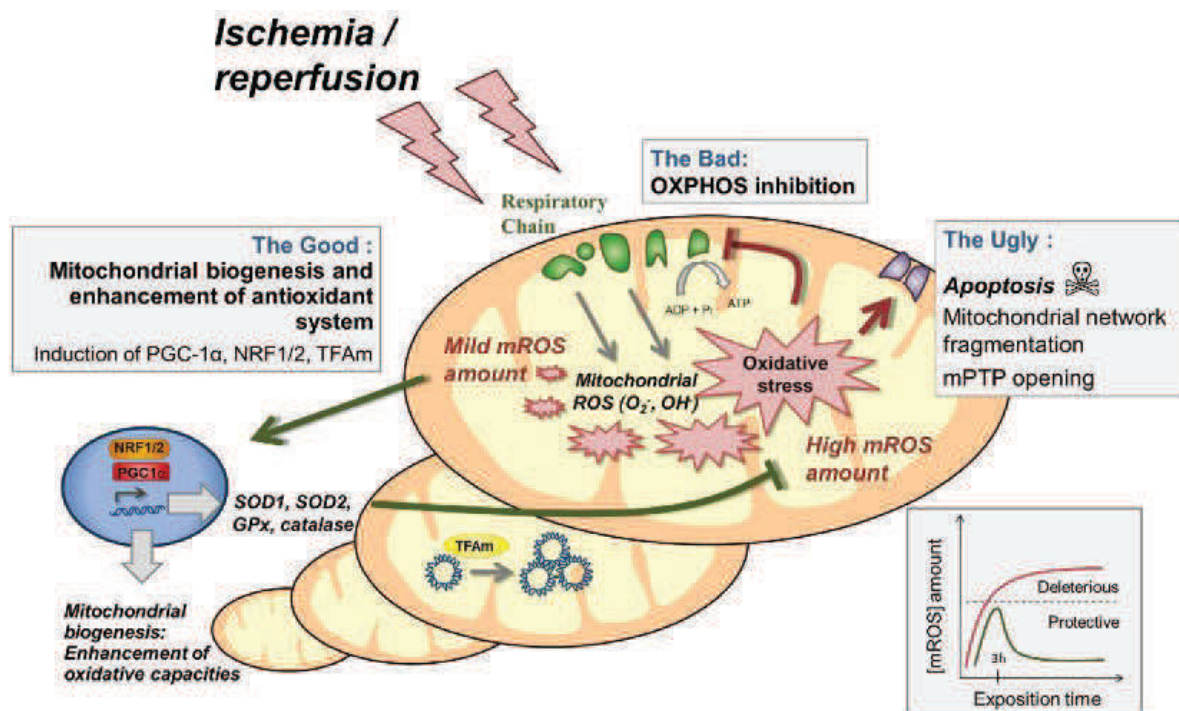


Figure 16. L'influence de la production de RLO sur la mitochondrie: the good, the bad and the ugly (Lejay *et al.*, 2014).

L'ischémie-reperfusion est connu pour ses effets délétères sur le muscle squelettique. En cas de forte augmentation de production de RLO, ceci va inhiber la phosphorylation oxydative et conduire à l'apoptose (the bad and the ugly). Cependant, une augmentation modérée de RLO est connu pour

activer la biogenèse mitochondriale avec une augmentation des enzymes antioxydants (the good), conduisant à une amélioration des capacités oxydatives et ainsi à une protection/augmentation de la respiration mitochondriale. *ADP*, adenosine diphosphate; *ATP*, adenosine triphosphate; *GPx*, glutathione peroxidase; *mPTP*, mitochondrial permeability transition pore; *ROS*, reactive oxygen species; *NRF*: nuclear respiratory factor; *PGC-1*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha; *Pi*, inorganic phosphate; *SOD*, superoxide dismutase; *TfAM*, transcription factor A, mitochondrial. Extrait de figure tiré de Lejay et al. (Lejay et al., 2014).

En conclusion, l'émergence du rôle des RLO dans la modulation de la signalisation intracellulaire, et de ce fait dans celle de certaines fonctions cellulaires, est reconnue par de nombreux travaux réalisés ces quinze dernières années. Des études expérimentales poursuivent l'exploration des mécanismes impliquant les RLO dans la cellule, et font progresser les connaissances, malgré certains écueils liés à l'approche in vitro parmi lesquels la difficulté de doser spécifiquement une espèce radicalaire donnée sans interférence avec une autre. Le champ d'investigation est donc encore vaste, mais tout indique aujourd'hui que ces molécules simples mais très réactives que sont les RLO sont des modulateurs majeurs des fonctions cellulaires, et sont impliqués aussi bien dans la régulation en conditions physiologiques que dans les dysfonctionnements cellulaires dans différentes pathologies (stress oxydant). L'exercice physique semble par ailleurs déclencher le phénomène de "mitohormèse", en augmentant modérément la production de RLO au niveau mitochondrial, déclenchant l'activation des mécanismes de protection cellulaire et en particulier mitochondrial (activation de la biogenèse mitochondriale et des capacités antioxydantes) mais sans pour autant avoir des effets délétères, au niveau du muscle squelettique.

3. LES DETERMINANTS DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE MAXIMALE (VO₂MAX)

Dans les parties précédentes, nous avons placé la mitochondrie au centre de nos intérêts. En effet, nous avons détaillé la contraction musculaire, dépendante des réserves en ATP et phosphocréatine, renouvelées essentiellement par la voie aérobie, dont les principales étapes ont lieu dans la mitochondrie. Ce renouvellement en ATP dépend donc de la capacité de la mitochondrie à utiliser l'oxygène, mais également de l'apport en oxygène jusqu'à la

cellule musculaire. Ainsi, il est capital d'apporter suffisamment d'oxygène aux mitochondries afin de pouvoir soutenir une production d'ATP importante et continue lors d'un exercice de haute intensité. Cette capacité à apporter de l'oxygène jusqu'au muscle est dépendante des différentes étapes de la voie de transport de l'oxygène des poumons jusqu'à la fibre musculaire. C'est ce que nous allons vous présenter dans cette partie, où nous analyserons les facteurs limitants la consommation maximale d'Oxygène ($VO_2\text{max}$), qui est donc lié au maximum de production d'ATP de façon aérobie dans le muscle squelettique lors de l'exercice. Cette partie sera nécessaire afin de mieux comprendre les adaptations mitochondriales, notamment lorsque la capacité à produire de l'ATP devient limitante (découplage mitochondrial) et de caractériser quelles sont les répercussions sur la capacité à l'exercice.

La consommation maximale d'Oxygène ($VO_2\text{max}$) est définie comme la quantité maximale d'oxygène par unité de temps qu'un individu peut consommer, c'est à dire, prélever, transporter, et utiliser, dans des conditions d'exercice qui sollicitent totalement ses possibilités cardiovasculaires. Son expression est en l/min ou en ml/min/kg. Chez l'adulte jeune de sexe masculin, la $VO_2\text{max}$ s'élève à environ à 3 l/min pour les hommes (soit 10 fois la valeur de repos), et 2 l/min pour les femmes. En valeur relative, $VO_2\text{max}$ est d'environ 45 ml/min/kg pour les hommes (ce qui représente environ une puissance maximale aérobie (PMA) de 250 watts mesurée sur ergocycle), et 35 ml/min/kg pour les femmes (soit une PMA d'environ 200 watts sur ergocycle). Les valeurs limites relevées chez des athlètes spécialisés dans les sports d'endurance sont de 95 ml/min/kg pour les hommes (soit plus 5,5 l/min pour un sujet de 60 kg), et 75 ml/min/kg pour les femmes (soit près de 4 l/min pour un sujet de 50 kg). Exemple: Richard Virenque : 70 ml/min/kg; Erwan Menthéour : 97 ml/min/kg. Chez le rat, lors d'un exercice triangulaire maximal, nos résultats, publiés récemment, montrent une consommation d'oxygène maximale de 83 ml/min/kg (Schlagowski *et al.*, 2014).

Lors d'un effort progressif, la consommation d'oxygène (VO_2) augmente de manière linéaire avec l'intensité de l'exercice jusqu'à un niveau caractérisé par une absence d'augmentation de l'oxygène consommé malgré une majoration de la charge de travail. Selon Di Prampero *et al.* (Di Prampero *et al.*, 1970), l'athlète atteindrait alors un état d'équilibre ou alors son niveau maximal ($VO_2\text{max}$). Cependant, la consommation maximale d'oxygène est limitée par plusieurs facteurs.

3.1. Les facteurs limitant la consommation maximale d'Oxygène ($VO_2\text{max}$)

La consommation maximale d'oxygène dépend des capacités de prélèvement de l'oxygène, de transport de l'oxygène, et d'utilisation de l'oxygène par l'organisme. L'étape circulatoire du transport de l' O_2 a lieu des capillaires pulmonaires et se finie au niveau des capillaires musculaires. L'apport en O_2 est donc dépendant du flux sanguin, c'est à dire dépendant du débit cardiaque au niveau systémique et par le débit sanguin local au niveau musculaire. La consommation maximale d'oxygène fait donc intervenir trois grands systèmes pour assurer le passage de l' O_2 de l'atmosphère jusqu'à la mitochondrie: le système pulmonaire (deux étapes de diffusion au niveau des poumons), le système cardiovasculaire (le transport de l' O_2 par convection dans la circulation sanguine), la microcirculation périphérique (les muscles), la dernière étape correspond à la consommation d' O_2 au niveau des mitochondries et donc à la diffusion de l'oxygène du capillaire jusqu'à la mitochondrie à l'intérieur de la fibre musculaire (Weibel *et al.*, 1991). Toutes ces étapes sont susceptibles de limiter la $VO_2\text{max}$.

3.1.1. Les facteurs centraux

3.1.1.1. Le système pulmonaire

La demande énergétique d'un athlète d'endurance (par exemple un marathonien) nécessite chaque minute l'échange d'environ 4 litres de gaz. Pour permettre une telle performance, les poumons contiennent plus de 300 millions d'alvéoles pour une surface d'échange alvéolo-capillaire représentant approximativement 20 à 50 fois la surface corporelle totale (50 à 100m²). Pour la plupart des individus réalisant un exercice exhaustif au niveau de la mer, les capacités pulmonaires sont suffisantes et même excessives pour maintenir la saturation du sang artériel en O_2 supérieure à 95% (Weibel *et al.*, 1991). Bien que des controverses existent, le système pulmonaire n'est généralement pas considéré comme un facteur limitant de la consommation maximale d'oxygène chez des sujets sédentaires. Néanmoins, chez les athlètes très entraînés en endurance ($VO_2\text{max} > 60$ ml/min/kg), il semblerait que la diffusion alvéolo-capillaire limite $VO_2\text{max}$ (Lindstedt & Hoppeler, 1995). En effet, seuls des athlètes élités en endurance ont montré une désaturation en O_2 durant un exercice maximal (Dempsey *et al.*, 1984). Le débit extrêmement important chez ces athlètes diminue fortement le temps de transit des globules rouges dans les capillaires pulmonaires.

Par conséquent, la durée pendant laquelle le sang se trouve dans les capillaires pulmonaires est insuffisante pour le saturer entièrement en O₂.

3.1.1.2. Le Débit cardiaque maximal (Q_{max})

Dès le début du XX^{ème} siècle, le Q est décrit comme un facteur limitant de la VO₂max. La principale variable expliquant la différence de VO₂max entre des sujets sédentaires et des athlètes est le débit maximal, en démontrant que 5,9 à 7,5 l/min de débit étaient nécessaires par litre de VO₂ (Saltin & Stenberg, 1964). La variabilité observée dans cette relation dépend principalement de deux facteurs : la concentration en hémoglobine et le volume d'éjection systolique maximal (Saltin & Stenberg, 1964; Bassett & Howley, 2000). La quantité d'O₂ contenue dans le sang artériel (environ 200 ml d'O₂/min) diminue en traversant les muscles actifs pour atteindre environ 20 ml O₂/min veineux. Ainsi, au maximum de l'exercice, quasiment tout l' O₂ disponible est extrait du sang qui perfuse les muscles actifs. Le débit cardiaque est déterminé par la fréquence de contraction du ventricule gauche (battements/min ou bpm), et par le volume de sang éjecté à chaque systole, soit par la fréquence cardiaque (FC) et le volume d'éjection systolique (VES, ml), selon l'équation suivante:

Q_C (l/min) = FC (bpm) × VES (ml) : 1000. Au repos et en position assise, Q avoisine 5 l/min chez le sujet sain (Astrand *et al.*, 1964) pour des combinaisons très variées de FC (50-85 bpm) et de VES (60-100 ml). A l'exercice, on constate un accroissement du débit cardiaque consécutif à une augmentation conjuguée du volume d'éjection systolique (jusqu'à 50% de VO₂max) et de la fréquence cardiaque (jusqu'à une valeur limite déterminée par l'âge et égale approximativement à 220 – âge). Pour le VES, il semble bien accepté que ce paramètre augmente avec l'intensité d'exercice jusqu'à environ 50% de VO₂max (Vella & Robergs, 2005). Au-delà de cette intensité, l'évolution du VES est plus débattue, avec certains travaux suggérant une poursuite, voire une accélération de l'augmentation de VES, alors que d'autres résultats montrent plutôt une tendance au plafonnement (McLaren *et al.*, 1997), voire à la chute (Mortensen *et al.*, 2005) avant l'atteinte de VO₂max (Mortensen *et al.*, 2005). L'augmentation de VO₂max par l'entraînement s'accompagne d'une augmentation marquée du débit cardiaque maximal. Cette augmentation ne dépend pas de la FC max (qui n'est pas affectée par l'entraînement), mais dépend d'un accroissement du volume d'éjection systolique consécutif à une augmentation de volume des ventricules et de la force de contraction du myocarde (VES peut atteindre 200 ml chez des athlètes à VO₂max proche de 6 l/min). Il a été estimé que 70-85% de la limitation de la VO₂max est liée au débit cardiaque maximum

(Bassett & Howley, 2000), mais tous les auteurs ne sont pas d'accord sur ce chiffre et certains pensent que la limitation se situe plutôt au niveau périphérique.

3.1.1.3. Le transport d'oxygène

L'oxygène est transporté par le sang soit sous forme dissoute soit lié à l'hémoglobine (Hb). La forme dissoute constitue un mode de transport très minoritaire (près de 1%). En revanche, l'essentiel de l'O₂ est transporté par l'hémoglobine présente dans les globules rouges (99%), entrant dans la composition sanguine pour environ 45 à 50% (hématocrite). Chaque Hb peut fixer quatre molécules d'O₂ et la capacité de transport sanguin de l'O₂ est étroitement dépendante du nombre de globules rouges et de leur saturation. Le contenu sanguin en O₂ est défini par la formule suivante :

$$\text{Contenu en O}_2 \text{ (ml/l)} = (1,34 \times [\text{Hb}] \times \text{Sa O}_2) + (0,003 \times \text{P O}_2)$$

Où 1,34 représente le pouvoir oxyphorique massique ou le volume d'O₂ pouvant être fixée par un gramme Hb (ml O₂/g Hb), Sa O₂ (%) correspond à la saturation des globules rouges en O₂, [Hb] est la concentration sanguine en Hb (g/100ml sang) et P O₂ est la pression sanguine en O₂ (mmHg). Chez l'homme sain, au repos, [Hb] vaut environ 15 g/100ml sang, la saturation est proche de 98% dans le sang artériel et le contenu artériel en O₂ (Ca O₂) atteint 20,4 ml/100ml de sang. A l'exercice, une hémococoncentration se développe dès 50% de VO₂max (Mortensen *et al.*, 2005) et le Ca O₂ augmente pour atteindre des valeurs proches de 21 ml/100ml de sang à VO₂max. Ainsi, la réinjection de 900 à 1350 ml de sang permet d'augmenter la VO₂max de 4 à 9% (Gledhill, 1982). De nouvelles méthodes ont été développées à des fins thérapeutiques, pour augmenter artificiellement cette capacité de transport. Ces techniques sont toutefois régulièrement détournées par le milieu sportif. Ainsi, la capacité de transport de l'oxygène par le sang correspond au produit du débit cardiaque par la concentration du sang artériel en oxygène (Q X Ca O₂). C'est la quantité d'oxygène dont disposent les tissus chaque minute. La concentration du sang artériel en oxygène fait intervenir deux paramètres: la concentration en hémoglobine (Hb), et le niveau de saturation de l'hémoglobine par l'oxygène (Sa O₂). Or le contenu artériel en oxygène (CaO₂) n'est pas significativement différent entre les sujets disposant d'une consommation maximale d'oxygène faible, moyenne ou élevée. Ceci laisse supposer que c'est surtout le débit cardiaque qui soit l'élément essentiel de variabilité de VO₂max.

3.1.2. Les facteurs périphériques

3.1.2.1. L'aspect structural: densité capillaire

Dans le muscle squelettique, les capillaires se situent le long de l'axe longitudinal des fibres musculaires et c'est à travers ces capillaires que s'effectuent les échanges entre les compartiments sanguin et musculaire. Aussi, leur rôle est primordial pour l'apport de l'O₂ aux muscles. Le degré de sinuosité varie en fonction de la longueur des sarcomères et s'avère un déterminant important de la surface totale du capillaire. Plus précisément, il a été démontré que la taille de l'interface entre le capillaire et la fibre est de première importance dans la détermination du flux d'O₂ du capillaire à la mitochondrie (Mathieu-Costello *et al.*, 1992). Le nombre de capillaires par fibre musculaire est couplé au profil métabolique et à la taille de la fibre. Plus la fibre a un métabolisme oxydatif, plus sa densité capillaire est importante (Degens *et al.*, 1992).

3.1.2.2. Le gradient de diffusion de l'oxygène

Le passage de l'O₂ entre la surface du globule rouge et le sarcolemme représente le principal site de résistance à la diffusion de l'O₂, la PO₂ chutant fortement. Un gradient important de PO₂ entre le compartiment sanguin et la cellule musculaire permet de vaincre cette résistance et d'assurer l'apport d'O₂ au tissu. Notamment par des procédés expérimentaux utilisant l'hyperoxie qui montraient qu'un plus grand apport en O₂ pouvait améliorer la VO₂max, un certain nombre d'études ont suggéré l'existence d'une limitation de la VO₂max essentiellement du faite de la limitation au niveau de l'apport en O₂ (Powers *et al.*, 1989). Cependant, c'est surtout le gradient de diffusion capillaro-tissulaire qui est limitant plutôt que la délivrance d' O₂. Ainsi, la diffusion de l'oxygène dépend de l'interaction entre le transport de l'O₂ par la myoglobine et sa consommation par la mitochondrie.

3.1.2.3. L'aspect fonctionnel: capacités oxydatives musculaires

La mitochondrie est l'étape ultime de la consommation d'oxygène et les capacités oxydatives maximales de la population mitochondriale, reflet de l'importance du contenu mitochondrial musculaire, sont corrélées positivement à la VO₂max (Zoll *et al.*, 2002) chez l'homme. Les études chez l'homme ont montré que la VO₂max n'augmentait que de 10-20% après un entraînement en endurance bien calibré, alors que les enzymes mitochondriales

augmentaient de plus de 200% (Saltin *et al.*, 1977). Ainsi, il a été proposé que l'augmentation des capacités oxydatives permette l'augmentation de la performance en endurance plutôt que l'amélioration de la $VO_2\text{max}$. Ainsi, pour un exercice sous maximal, l'augmentation des capacités oxydatives observées dans les muscles entraînés induit de plus faibles perturbations du fonctionnement cellulaire. L'augmentation du nombre des mitochondries évite également à la mitochondrie de fonctionner au maximum de ses possibilités et lui permet donc de continuer de fonctionner à un rendement qui reste optimum. D'un autre côté, l'augmentation des capacités oxydatives joue un rôle permissif pour l'augmentation de la $VO_2\text{max}$. On peut également penser que l'augmentation du nombre de mitochondries va permettre une meilleure extraction de l' O_2 à partir du sang artériel, contribuant, de façon importante, à l'augmentation de la $VO_2\text{max}$.

3.2. Limitation centrale ou périphérique ?

La détermination du principal facteur limitant la $VO_2\text{max}$ fait toujours débat. La réduction d'une des étapes dans le transport de l' O_2 induit une diminution de la $VO_2\text{max}$. En définitive, les différents éléments qui composent le système d'échanges gazeux conditionnent plus ou moins la grandeur de la consommation maximale d'oxygène (voir figure 17). Mais quel élément peut jouer un rôle prépondérant dans sa limitation ? Bien que des controverses existent, le système pulmonaire (respiratoire) n'est généralement pas considéré comme un facteur limitant de la consommation maximale d'oxygène chez des sujets en bonne santé, à l'exception de deux cas de figures. Ainsi, chez l'athlète très entraîné ($VO_2\text{max} > 85$ ml/min/kg) et à l'exercice maximal : la PaO_2 diminue, environ 75 mmHg et la SaO_2 se situe aux environs de 90%. Nous observons alors une hypoxémie induite par l'exercice, or lorsque l'athlète atteint la limite de VE, il atteint alors une limite de capacité de diffusion de l' O_2 . Deuxièmement situation, lors d'une diminution de la PO_2 en altitude (Faulkner *et al.*, 1968), (dès 1000 mètres d'altitude). Ainsi la pression inspirée en O_2 au niveau de la mer = 150 mmHg; Pression inspirée en O_2 à 6300 mètres = 60 mmHg). Ainsi, dans ces deux situations la diffusion alvéolo-capillaire participe activement à la limitation de la $VO_2\text{max}$.

Au niveau du système cardio-vasculaire (Débit cardiaque, capacité de transport de l'oxygène par le sang, contenu artériel en O_2), il semblerait que le principal facteur limitant $VO_2\text{max}$ soit le débit cardiaque maximal, surtout chez les sujets entraînés. Il existe une relation sensiblement linéaire entre l'augmentation de $VO_2\text{max}$ liée à l'entraînement et celle

du débit cardiaque maximal: chez l'homme, toute augmentation de $VO_2\text{max}$ de 1 l/min correspond à une augmentation de Q d'environ 5 l/min (des valeurs de Q de 40 l/min ont été observées chez des athlètes dont $VO_2\text{max}$ est de 6 l/min). Andersen & Saltin prouvent que lorsqu'une plus grande part du Q perfuse le muscle actif, ce muscle est capable d'atteindre des vitesses de consommation de l' O_2 bien supérieures. Ainsi selon ces auteurs, la $VO_2\text{max}$ serait limitée par l'apport en O_2 au muscle et non par la capacité du muscle à consommer de l' O_2 .

Au niveau périphérique (muscles), les capacités oxydatives musculaires semblent fortement limiter la $VO_2\text{max}$. Contrairement aux constats d'Anderson & Saltin (1985), si les muscles reçoivent suffisamment d'oxygène des niveaux périphériques, encore faut-il que cet oxygène puisse être utilisé au niveau local. $VO_2\text{max}$ dépend donc également de l'aptitude des muscles à utiliser l'oxygène. Cette limitation dite « périphérique » va dépendre principalement de la typologie des muscles (la richesse en fibres I et IIa), ainsi que de l'activité des enzymes oxydatives dans les mitochondries: des relations ont été démontrées entre la quantité d'enzymes du cycle de Krebs (SDH = succinate déhydrogénase) et $VO_2\text{max}$. Le rôle joué par l'aspect qualitatif de la fonction mitochondriale comme facteur limitant de la $VO_2\text{max}$ ou de la performance aérobie, reste cependant encore inexploré. Ainsi, dans la principale étude mon travail de thèse, nous avons essayé de vérifier l'hypothèse selon laquelle une altération fonctionnelle de la mitochondrie limiterait la $VO_2\text{max}$ (Schlagowski *et al.*, 2014).

Ainsi les défenseur de la limitation périphérique propose que le facteur limitant pourrait varier avec l'aptitude aérobie. La consommation maximale d'oxygène des sujets moyennement aptes ($VO_2\text{max}$ entre 35 et 50 ml/min/kg) semble être limitée par les possibilités fonctionnelles musculaires. En effet, chez ces sujets, une altération de leur capacité de transport de l'oxygène par un bêta-bloquant n'a pas d'effet sur leur $VO_2\text{max}$. En revanche, les sujets dotés d'une bonne aptitude aérobie ($VO_2\text{max}$ entre 50 et 60 ml/min/kg) ont une baisse de $VO_2\text{max}$ quand leur capacité de transport de l'oxygène est diminuée par un bêta-bloquant. Le débit cardiaque serait donc, dans ce cas, facteur limitant. Enfin, chez les athlètes bien entraînés dont la consommation maximale d'oxygène est supérieure à 60 ml/min/kg, l'apparition d'une désaturation oxyhémoglobinée à l'approche de l'exercice maximal, laquelle disparaît sous hyperoxie légère, permet de penser à une limitation respiratoire. (R.Flandrois, Le métabolisme aérobie à l'exercice musculaire, *in Biologie de l'exercice musculaire*, sous la direction de J.R.Lacour, Masson, Paris, 1992).

En conclusion, l'apport en O_2 joue clairement un rôle central puisque la mitochondrie a la capacité d'exploiter entre 60 et 80% de ces capacités oxydatives *in vitro* lors d'un exercice à $VO_2\max$ (Taylor *et al.*, 1987). Ceci suggère que l'augmentation de l'apport en O_2 par le débit cardiaque de façon aigu conditionne la limite supérieure de la $VO_2\max$. Cependant, c'est bien la périphérie qui fixe la demande en O_2 et les capillaires qui déterminent la conductance de l' O_2 . Ils contribuent à déterminer les possibilités d'extraction maximales pour un certain niveau d'apport en O_2 . Ainsi, bien que le muscle ait une dépendance vis-à-vis de l'apport en O_2 par le système cardiovasculaire, le muscle est capable de s'adapter ou de se désadapter de façon importante, ce qui fait de lui un véritable acteur de la détermination de la $VO_2\max$. La consommation d' O_2 maximale est donc à la fois limitée par les facteurs centraux et périphériques. Cependant, on retrouve plutôt des limites périphériques chez les sédentaires, et des limites centrales chez les sujets bien entraînés, ce qui fait penser qu'il n'y a pas de règle générale et que les limitations peuvent varier d'un individu à l'autre. Cette discussion sera continuée après l'exposé de mes résultats, dans la partie "discussion générale".



Figure 17. Les différentes étapes de la consommation d'oxygène. Actuellement, il n'y a pas d'idée commune sur les facteurs limitant de la consommation maximale de l'oxygène. En principe, une défaillance à différents niveaux pourrait avoir des conséquences sur la diminution de $VO_2\max$ et la capacité à l'exercice. A savoir au niveau :

- du système ventilatoire
- de la diffusion alvéole-artère

- du système cardiovasculaire
- du transport d' O₂ par le sang (artères)
- de la diffusion capillaire-cellule musculaire
- des mitochondries (taille et nombre)
- du type de fibres musculaires
- du retour C O₂ par les veines
- du système cardiovasculaire
- de la diffusion veine-alvéole
- du système ventilatoire

4. MODIFICATION DU PHENOTYPE MUSCULAIRE ET EFFET SUR LES ADAPTATIONS MITOCHONDRIALES APRES UN ENTRAÎNEMENT EN ENDURANCE

Après avoir détaillé dans une première partie la contraction musculaire, le fonctionnement de la mitochondrie ainsi que les facteurs limitant la VO₂max, nous allons, à présent nous intéresser aux modifications du phénotype musculaire après un entraînement en endurance. En effet, dans nos trois études, nous avons pu mettre en évidence des changements mitochondriaux (aigu/chronique) face à une situation de stress. En effet, nous allons voir, que l'exercice induit un stress important, obligeant notre organisme, et en occurrence la mitochondrie à mettre en place des systèmes adaptatifs afin d'assurer une production d'ATP suffisante pour réaliser des contractions musculaires efficaces.

4.1. Les effets sur le phénotype contractile

L'entraînement prolongé en endurance se traduit par une diminution de l'expression des formes les plus rapides des chaînes lourdes de la myosine (MHC) (MHC-IIb et/ou MHC- IIX), essentiellement au profit de la forme rapide associée à un métabolisme énergétique oxydatif (MHC-IIa), beaucoup plus rarement au profit de la forme lente (MHC-I) (Booth & Thomason, 1991). Par exemple chez le petit rongeur, lorsque les animaux sont entraînés à courir à une intensité élevée (30m/min, 20% d'inclinaison, 75% VO₂max) pendant plusieurs semaines, la proportion des MHCs IIA et IIX est augmentée alors que la proportion des MHC IIB est

significativement diminuée dans le muscle gastrocnémien. A l'opposé, on note une augmentation de l'expression des MHC I uniquement si la durée d'exercice quotidien est augmentée de façon très importante (Demirel et al. 1999). Chez les marathoniens et les athlètes en endurance, la proportion des MHC I atteint 80-90% des MHCs totales, les 10-20% restant se composent de MHC IIA (Andersen *et al.*, 2000). D'un autre côté, l'entraînement en endurance à haute intensité sur une courte période, induit une transition des MHCs rapides vers les MHCs lentes dans le muscle vaste externe (Schaub *et al.* 1989).

Trois principales voies de signalisations intracellulaires semblent être impliquées dans le contrôle de l'expression des isoformes de MHC, assurant ainsi la transduction des signaux générés lors de la contraction musculaire. Il s'agit de la voie des MRFs (myogenic regulatory factors), d'une voie de signalisation calcique comprenant la calcineurine et un facteur de transcription de la famille des NF-AT (nuclear factor of activated T cell), et de la cascade des MAPkinases (mitogen- activated protein kinases).

4.2. Les effets sur le phénotype métabolique

Pour les disciplines d'endurance, l'intensité des exercices réalisés à l'entraînement, voire en compétition, peut être définie à partir de la puissance métabolique générée par les métabolismes aérobie et des stimuli métaboliques qui lui sont associés. De nombreux paramètres physiologiques ont été affectés après un entraînement en endurance, tels que la FC, la lactatémie ou la VO_2 , exprimés en valeurs absolues ou relatives (%max). Cela suggère que les flux d'énergie liés aux métabolismes aérobie induisent des perturbations de l'homéostasie cellulaire plus ou moins importantes en fonction de l'intensité d'exercice et donc de la stimulation métabolique associée.

Dans ce contexte, l'intensité d'exercice, les perturbations de l'homéostasie intracellulaire et les signaux métaboliques qui l'accompagnent sont considérés comme de puissants stimuli qui induisent des adaptations métaboliques à la fois structurelles et fonctionnelles (Flück & Hoppeler, 2003; Flück, 2004). L'entraînement en endurance vise à produire une puissance mécanique soutenue plus importante, tout en retardant l'apparition de la fatigue et/ou de la douleur. Ainsi, l'entraînement en endurance active la biogenèse mitochondriale dans le muscle (cf chapitre: les effets sur le contrôle transcriptionnel de la biogenèse mitochondriale). Cette biogenèse mitochondriale est une conséquence des changements métaboliques musculaires se

produisant au cours de l'exercice. En effet, durant la contraction musculaire, l'élévation de l'ADP favorise la réaction catalysée par la créatine kinase vers la formation de créatine et d'ATP. Il a été démontré qu'une plus faible augmentation d'ADP était nécessaire pour atteindre le même niveau de consommation d'oxygène (Dudley *et al.*, 1987). L'ADP étant un activateur allostérique de la glycolyse anaérobie, celle-ci ne va donc être que faiblement activée, diminuant la production d'acide lactique. De plus, l'acide lactique formé est plus efficacement éliminé après un entraînement en endurance. Plus la densité mitochondriale sera importante et moins la glycolyse anaérobie est sollicitée. Ces adaptations aboutissent donc à un changement conséquent du métabolisme énergétique, avec comme principale conséquence l'amélioration de la résistance à la fatigue.

Des signaux impliqués dans l'initiation de la voie d'expression des gènes en réponse à l'activité contractile résultent probablement de la combinaison de l'accélération du taux de renouvellement de l'ATP et/ou des déséquilibres entre la synthèse d'ATP mitochondriale et la demande d'ATP cellulaire et/ou des flux calciques. En effet, ce déséquilibre provoque des altérations de l'homéostasie calcique. Il s'ensuit une induction des voies de transduction du signal, menant à la phosphorylation ou à la déphosphorylation de certains facteurs de transcription et/ou de stabilisation. L'activité contractile, plutôt que les facteurs neurotrophiques et humoraux, pourrait activer la phosphorylation des kinases. Des études récentes ont mis en évidence une des protéines ayant un rôle fondamental dans la détection et la signalisation du niveau énergétique du muscle : l'AMPK (AMP-activated protein kinase). Cette protéine semble contrôler la charge énergétique de la fibre musculaire et initier les réponses qui préviennent la déplétion des stocks énergétiques. L'AMPK est activée allostériquement par la 5'-AMP et inhibée allostériquement par la PCr. Sa phosphorylation, qui se fait par l'AMPK kinase, provoque son activation. Ainsi, en réponse à la contraction musculaire, l'AMPK est activée dans le muscle humain et de rat, et l'importance de l'activation dépend du niveau de la charge et de la concentration musculaire en glycogène (pour revue voir (Winder, 2001). L'AMPK va phosphoryler à son tour des protéines impliquées dans l'oxydation des acides gras et l'importation du glucose. Cette kinase joue également un rôle dans l'adaptation à l'entraînement en endurance en augmentant l'expression de certaines enzymes mitochondriales, de l'hexokinase, de GLUT-4, et d'UCP-3 (Winder *et al.* 2000). L'AMPK a donc la capacité à la fois de contrôler le niveau énergétique intramusculaire afin de stimuler le système en réponse à une augmentation de la vitesse

d'utilisation de l'ATP, et également d'augmenter la capacité de production de l'ATP par un accroissement des capacités oxydatives musculaires lorsque le muscle est exposé à un entraînement en endurance. Il en résulte une augmentation des capacités oxydatives de 50% à 100% après un entraînement de 6 semaines. Parallèlement les performances en endurance sont augmentées, mais avec une amélioration nettement plus faible de la $VO_2\text{max}$ (Davies *et al.*, 1981).

La mesure des marqueurs du métabolisme énergétique comme l'activité de la citrate synthase, ou l'activité de la COX, ont permis de démontrer qu'un entraînement en endurance de six semaines est nécessaire pour que le contenu en mitochondrie atteigne un nouvel état d'équilibre. Cependant, 7 jours d'entraînement à raison de 2 heures par jour à 60-70% de la $VO_2\text{max}$ est suffisant pour augmenter de 30% l'activité de plusieurs enzymes mitochondriales (Spina *et al.*, 1996). Ainsi, la période nécessaire pour atteindre un nouvel état d'équilibre dépend de la durée, de la fréquence et de l'intensité de l'exercice. Structurellement, il a été clairement démontré une densité volumétrique mitochondriale plus élevée dans les muscles de sujets entraînés en endurance comparé à des sujets contrôles.

D'autre part, le volume mitochondrial dans les muscles squelettiques augmente en proportion directe de la consommation d'oxygène globale dans les espèces athlétiques, comparées aux espèces normales. Taylor *et al.* (1987) proposent que ce soit uniquement l'augmentation du nombre de mitochondries, ayant toutes la même structure, qui permettrait d'ajuster la production d'énergie à la demande plutôt que la variation des vitesses de réaction des enzymes de la chaîne respiratoire. De plus, les changements dans les activités d'enzymes oxydatives sont proportionnels aux changements dans la densité volumétrique des mitochondries (pour revue voir (Hoppeler, 1986). Plus précisément, Hoppeler *et al.* démontrent que l'entraînement en endurance provoque préférentiellement la prolifération des mitochondries sous-sarcolemmales, qui normalement représentent seulement 10 à 15% du volume total, mais peuvent atteindre jusqu'à 30% chez les cyclistes professionnels. Lorsque l'on regarde les adaptations en fonction du type de fibre, on s'aperçoit que ce sont les fibres de type IIa qui montrent une augmentation relative de leur volume mitochondrial plus importante par rapport aux fibres de type I ou IIx (Howald *et al.*, 1985), même si le type de protocole d'entraînement (intensité élevée en intermittent ou faible intensité pendant une longue période) peut faire varier les proportions. Seuls les muscles voyant leur production énergétique augmentée au cours de l'exercice sont affectés par l'entraînement en endurance

alors que les autres muscles ont même plutôt tendance à diminuer leur volume mitochondrial (Saltin *et al.* 1976).

L'utilisation de la technique des fibres perméabilisées à la saponine permet d'aborder l'aspect qualitatif de la fonctionnalité de la mitochondrie et n'a été utilisée que récemment chez l'homme. Elle a permis de montrer, en plus d'une augmentation des capacités oxydatives musculaires que la sensibilité mitochondriale à l'ADP est plus faible d'une part lorsque le pourcentage de fibre de type I est plus élevé dans le muscle et d'autre part suite à une période d'entraînement ((Zoll *et al.*, 2002); Tonkonogi *et al.* 1998; Walsh *et al.* 2001).

4.2.1. L'amélioration de l'extraction d' O₂

Deux mécanismes sont impliqués dans cette amélioration : l'augmentation du Q_{muscle} permet un apport plus important d'O₂ au muscle et le développement du réseau capillaire amplifie la surface d'échange entre les compartiments sanguin et musculaire. La comparaison entre des souris ayant des capacités d'exercices fortement différentes a démontré qu'une augmentation de la capacité d'extraction de l'O₂, sans modification du Q_{max} , est à l'origine des différences de performances (Gonzalez *et al.*, 2006). Ces résultats soulignent l'importance de l'adaptation musculaire dans l'amélioration des performances aérobies.

4.2.2. L'amélioration du débit sanguin musculaire

L'entraînement en endurance entraîne une augmentation du débit musculaire (Q_{muscle}) dans les muscles actifs lors d'exercices à intensités identiques ou lors d'efforts maximaux. Les mécanismes de régulation du Q_{muscle} restent en grande partie inconnus et les raisons expliquant l'augmentation de débit à même intensité sont spéculatives (Clifford & Hellsten, 2004). A l'effort maximal, l'augmentation du Q_{muscle} s'explique notamment par un Q plus important mais aussi par une meilleure redistribution du flux sanguin. Plusieurs mécanismes régulant le Q_{muscle} sont susceptibles d'évoluer avec l'entraînement. Le Q_{muscle} est fortement lié à l'utilisation d'O₂ pendant l'exercice (Andersen & Saltin, 1985). Une corrélation entre la saturation de l'hémoglobine en O₂ et la conductance musculaire des jambes, observée chez l'homme, confirme cette relation et suggère que les érythrocytes sont d'importants régulateurs du Q_{muscle} dans le muscle (Bangsbo *et al.*, 2001). Les augmentations de la masse musculaire et de la densité capillaire, grâce à l'entraînement, induisent un accroissement du volume sanguin qui facilite l'augmentation du débit. De plus, cet accroissement du réseau capillaire permet une

plus grande vasodilatation *via* l'augmentation de l'activité d'enzymes vasodilatatrices situées dans les cellules endothéliales, qui participent à la régulation du débit musculaire (Hillig *et al.*, 2003).

4.2.3. L'adaptation du réseau capillaire

De très nombreuses études, réalisées chez l'homme et sur des modèles animaux, ont permis de vérifier l'augmentation de la densité du réseau capillaire en réponse à l'entraînement en endurance (Adolfsson *et al.*, 1981). L'enrichissement du réseau capillaire, qui se traduit entre autre par une augmentation du nombre de capillaires autour de chaque fibre, se fait de manière homogène quel que soit le type de fibres, oxydatives ou glycolytiques. Cette réponse homogène du réseau capillaire contribue largement à améliorer l'approvisionnement du muscle en O₂ et substrats. L'arrangement spatial des capillaires permet une meilleure oxygénation tissulaire (Poole *et al.*, 1989). Un entraînement en endurance pendant quatorze semaines, a permis de démontrer une amélioration de la VO₂max, ainsi qu'une modification de l'arrangement vasculaire qui se traduit par une augmentation de la sinuosité capillaire (Charifi *et al.*, 2004). Le mécanisme mis en jeu au cours de cette croissance des capillaires, appelé angiogenèse, résulte de l'enchaînement de plusieurs étapes. Il débute par l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la déstructuration de la membrane basale des vaisseaux, puis se poursuit par la multiplication, la migration et la différenciation des cellules endothéliales pour former la trame du nouveau vaisseau, et se termine par la restructuration des parois vasculaires. Ce processus est contrôlé par des facteurs stimulants et inhibiteurs qui permettent un contrôle fin de l'angiogenèse (Folkman & Shing, 1992).

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est décrit comme le principal et le plus puissant facteur angiogénique. Il agit sur les cellules endothéliales par son action mitogène et intervient dans la perméabilisation des parois. L'hypoxie intracellulaire stimule la production de VEGF en activant le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor- 1). D'autres facteurs moléculaires participent au contrôle physiologique de l'angiogenèse, mais probablement à un degré moindre que le VEGF; ces facteurs sont le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor-), le TGF- (Transforming Growth Factor-), les angiopoïétines-1, -2, et la leptine. L'une des hypothèses actuelles est que l'hypoxie musculaire locale, induite par l'exercice, représenterait un stimulus important de l'angiogenèse musculaire, notamment par l'intermédiaire du gène VEGF. On a pu montrer

que l'expression du gène VEGF, à la fin de l'exercice, était majoritaire au sein des fibres les plus glycolytiques (les moins vascularisées), et qu'elle était associée à l'expression d'autres gènes sensibles à l' O_2 (Biro *et al.*, 2003). Il semble que l'angiogenèse induite par l'exercice n'ait pas exclusivement pour origine des facteurs métaboliques, mais qu'elle pourrait également être expliquée par des contraintes hémodynamiques appliquées aux cellules endothéliales. L'exercice exhaustif s'accompagne en effet d'une élévation du flux sanguin, des forces de tension et de cisaillements sur les parois vasculaires. Ainsi, les facteurs que l'on sait maintenant être augmentés à l'exercice, tel que le VEGF, sont certainement stimulés par plusieurs cascades de signalisation cellulaire, qui dépendent aussi bien de stimuli métaboliques (liés principalement à la baisse de la tension locale de l' O_2) qu'hémodynamiques.

4.3. Les effets sur le contrôle transcriptionnel de la biogenèse mitochondriale

L'augmentation des capacités oxydatives musculaires est l'une des réponses les plus précoces à l'entraînement en endurance. Cet entraînement en endurance se traduit par une augmentation de l'activité de très nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif (Holloszy & Coyle, 1984). Pourtant, des données récentes ont permis de montrer que ce type d'entraînement induisait non seulement une augmentation du pool musculaire de mitochondries, mais aussi de profondes modifications de l'activité fonctionnelle de ces organelles, avec une altération du ratio protéines/lipides dans la mitochondrie (Hood *et al.*, 2006). Ainsi, différents événements ont lieu suite à un entraînement en endurance, notamment au niveau moléculaire (activation de la biogenèse mitochondriale) (voir figure 19).

4.3.1. L'expression génique

Il est démontré que l'augmentation de l'expression des ARNm des facteurs de transcription précède la régulation mitochondriale (Pilegaard *et al.*, 2003). L'activité contractile est suivie de l'expression immédiate de certains gènes, protéines ou facteurs nucléaires tels que c-fos, c-jun, Sp1 ou encore Egr-1 qui participent à la régulation de la transcription de protéines mitochondriales. Leur activation se déroule dans les quatre premières heures suivant l'exercice mais, au bout de 24h, leur niveau d'expression retrouve quasiment leur valeur basale (Pilegaard *et al.*, 2000).

4.3.2. Le facteur PGC-1 α

Le PGC-1 α est considéré comme un des cofacteurs centraux de la régulation de la biogenèse mitochondriale (voir figure 18). Les coactivateurs de la famille PGC-1 jouent un rôle important dans le contrôle de la biogenèse et du fonctionnement de la mitochondrie en intégrant des signaux externes et internes et en augmentant de manière coordonnée l'activité de divers facteurs de transcription régulant l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le fonctionnement mitochondrial. Plusieurs facteurs peuvent réguler l'expression de PGC-1 α et de fait la biogenèse mitochondriale. Ainsi, l'augmentation de l'expression de PGC-1 α dans le muscle squelettique peut être induite par l'exercice aussi bien chez les rongeurs que chez l'Homme (Russell *et al.*, 2003).

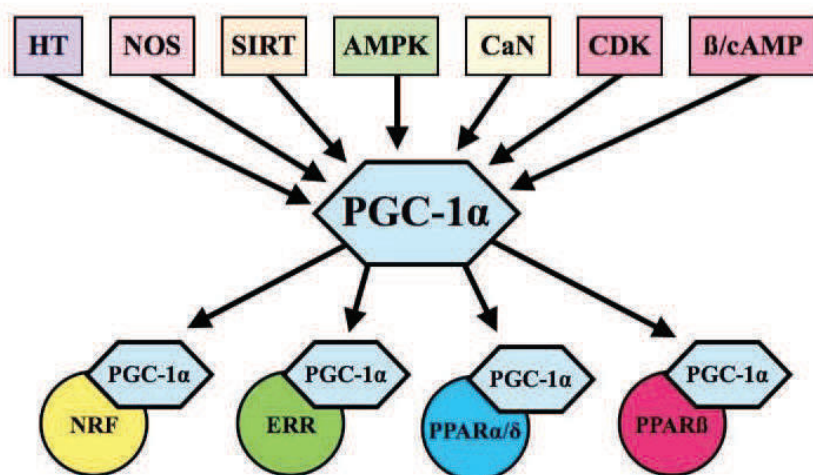


Fig 18. Régulation de PGC-1 α . Les hormones thyroïdiennes (HT), la NO synthase (NOS), les sirtuines (SIRT), les protéines kinases activées par l'AMP (AMPK), la calcineurine (CaN), les kinases dépendantes des cyclines (CDK) et la stimulation β -adrénergique (β /cAMP) régulent l'activité de PGC-1 α et *in fine* la transcription de facteurs comme les Nuclear respiratory factors (NRF), les récepteurs liés aux oestrogènes (ERR) et la famille des PPAR (d'après Ventura-Clapier *et al.*, 2008).

PGC-1 α a été identifié, par l'équipe de Spiegelman (Puigserver *et al.*, 1998) comme une protéine interagissant avec PPAR γ . PGC-1 β et PRC (PGC-1-Related Coactivator) ont été identifiés sur la base de leur similarité avec PGC-1 α . Ces trois coactivateurs partagent des caractéristiques moléculaires importantes pour la régulation des gènes impliqués dans le fonctionnement mitochondrial. La découverte de PGC-1 est un événement majeur dans la compréhension de la biogenèse mitochondriale et de l'augmentation de la respiration cellulaire. Le PGC-1 régule la transcription du Tfam *via* une co-activation du NRF1 (Wu *et*

al., 1999). Ainsi, PGC-1 α agit comme un régulateur de l'expression génique nucléaire et mitochondriale, ce qui en fait une protéine clé du contrôle de la biogenèse.

La répétition d'exercices entraîne une accumulation progressive du PGC-1 α qui, associée à l'augmentation du NRF1, permet d'activer l'expression du facteur de transcription mitochondrial Tfam (Irrcher *et al.*, 2003). Une étude chez des souris, dont l'activation de PGC-1 α est inhibée, a démontré une forte diminution de la fonction mitochondriale (Leone *et al.*, 2005). Ces résultats confirment le rôle primordial de PGC-1 α dans la régulation de la biogenèse, mais le fait qu'une faible activité persiste laisse supposer qu'il existe d'autres mécanismes de régulation. Lin *et al.* (Lin *et al.*, 2002) ont pu réaliser la surexpression de PGC-1 α sous le contrôle du promoteur de la créatine kinase, spécifiquement dans les fibres rapides du muscle squelettique. Cette surexpression a résulté en une conversion de fibres rapides IIB en fibres de type IIA ainsi qu'en fibres lentes de type I (20 et 10 % respectivement) dans le plantaris. À l'inverse, des souris déficientes pour PGC-1 α présentent une diminution du nombre de mitochondries et une diminution des capacités oxydatives dans les muscles lents (Leone *et al.*, 2005). Plus récemment, Handschin *et al.* (Handschin *et al.*, 2007) ont montré que des souris, chez lesquelles PGC-1 α est inactivé spécifiquement dans le muscle squelettique, présentaient une conversion de fibres lentes en fibres rapides, et étaient moins résistantes à l'exercice avec des dommages au niveau des fibres musculaires. Ce coactivateur transcriptionnel présente une forte homologie de structure avec celle de PGC-1 α (Lin *et al.*, 2002).

PGC-1 β coactive en partie les mêmes facteurs de transcription que PGC-1 α pour induire l'expression de gènes cibles communs tels que les gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial (Lin *et al.*, 2002). Cependant, PGC-1 β régule aussi d'autres facteurs de transcription qui ne sont pas des cibles de PGC-1 α . Il se pourrait que le rôle de PGC-1 α soit moins prépondérant que celui de PGC-1 β . En effet, PGC-1 β possède la capacité d'interagir avec le nuclear respiratory factor-1 (NRF1) et est donc un régulateur potentiel de l'activité de facteur de transcription de NRF1. De plus, la surexpression de PGC-1 β entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène et de la biogenèse mitochondriale dans le muscle (St-Pierre *et al.*, 2003). Enfin, PGC-1 β semble jouer un rôle plus important dans le cœur que PGC-1 α au niveau de la biogenèse mitochondriale (Ventura-Clapier *et al.*, 2008). Toutefois, les facteurs régulant l'activité de PGC-1 β ne sont pas

identiques à ceux régulant PGC-1 α . Ainsi, il semble que l'exercice n'entraîne pas d'activation de PGC-1 β dans le muscle squelettique contrairement à PGC-1 α (Meirhaeghe *et al.*, 2003).

4.3.3. Le facteur de transcription Tfam

La biogenèse mitochondriale requiert l'expression des génomes nucléaires et mitochondriaux pour assurer un développement homogène de l'organelle. La réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial sont régulées indépendamment du génome nucléaire mais dépendent de l'expression et de l'importation de plusieurs facteurs nucléaires. Une des protéines les plus importantes est Tfam (mitochondrial transcription factor A) qui est activée par NRF1 et importée dans la mitochondrie *via* Tom20. L'exercice augmente son niveau d'expression chez l'homme.

4.3.4. L'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire

La capacité de la mitochondrie à produire de l'énergie dépend du fonctionnement des complexes de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne. L'assemblage de ces complexes est unique car il nécessite un montage coordonné de sous-unités issues des génomes nucléaire et mitochondrial.

L'assemblage du complexe IV (COX), accepteur final des électrons, est le plus difficile car il nécessite l'association de treize sous-unités d'origine nucléaire et mitochondriale et requiert différentes protéines accessoires (SCO1, SCO2, COX 10 et Surf-1). Les trois sous-unités formant la structure centrale et catalytique de la COX (COX I-III) sont d'origine mitochondriale tandis que les autres sous-unités sont d'origine nucléaire et doivent être importées dans la mitochondrie (Aggeler & Capaldi, 1990). D'autre part, une spécificité liée au tissu de ce complexe a été démontrée avec des isoformes différentes selon les fibres musculaires (Kadenbach *et al.*, 1995).

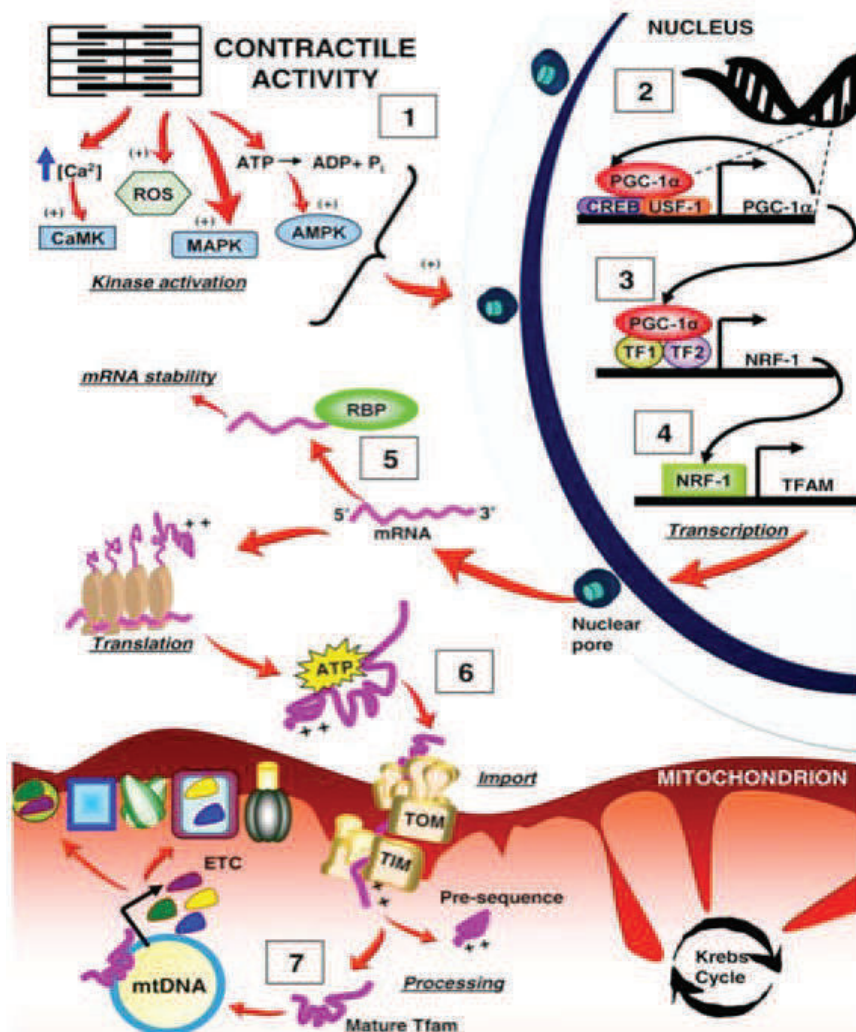


Figure 19. Biogenèse mitochondriale induite par l'activité physique au niveau du muscle squelettique. (1) La contraction musculaire provoque une élévation des radicaux libres (ROS), du calcium intracellulaire (Ca^{++}), des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) ou l'AMP (AMPK). (2) Ces multiples signaux activent la transcription et la synthèse de PGC-1 α . (3) PGC-1 α régule à son tour sa propre expression et active la transcription de multiples facteurs, dont NRF-1. (4) NRF-1 active alors la transcription de multiples protéines. (5) Parmi ces cibles, TFAM va suivre un processus dans le cytosol de stabilisation de l'ARN codant, de traduction (6) et de transfert dans la mitochondrie où TFAM va induire l'expression (7) des complexes de la chaîne respiratoire à partir de l'ADN mitochondrial (mtDNA) (Ljubicic *et al.*, 2010).

En résumé, le muscle est un tissu qui a des capacités d'adaptation importantes, notamment lors d'un entraînement en endurance. Le réseau capillaire, la capacité d'extraction et d'utilisation de l'O₂ sont augmentés avec l'entraînement en endurance et participent à l'amélioration des capacités oxydatives musculaires. Les phénotypes contractiles et métaboliques s'orientent majoritairement vers un phénotype de type lent-

oxydatif. L'utilisation des substrats énergétiques est modifiée par l'entraînement avec une utilisation accrue des lipides et une augmentation des réserves intramusculaires de l'ensemble des substrats. Si les mécanismes à l'origine de la biogenèse mitochondriale sont assez bien connus, l'influence de la modalité d'entraînement sur celle-ci n'est pas clairement établie et son influence sur la performance aérobie restent à être déterminé. Selon les caractéristiques de l'entraînement en endurance, il est possible que la fonction mitochondriale soit modifiée pour permettre une oxydation des substrats particulièrement adaptée à l'effort. Après un entraînement en endurance la population mitochondriale musculaire est augmentée, cependant, l'influence d'un dysfonctionnement qualitatif de la fonction mitochondriale (découplage) sur les adaptations mitochondriales reste à être démontré. Dans une des parties précédentes, nous avons développé un chapitre sur la production de RLO. Cette dernière prend maintenant toute son importance, puisque l'entraînement est connu pour augmenter les RLO, nécessaires dans l'activation du métabolisme cellulaire.

4.4. L'augmentation du métabolisme et la production de radicaux libres

Il est connu que l'exercice en général produit de l'oxygène chimiquement très réactif, ou des radicaux libres, par au moins deux voies différentes. La première a lieu dans la mitochondrie via une perte d'électrons, probablement au niveau d'un cytochrome, produisant ainsi des radicaux superoxydes. La seconde se produit au cours de la modification du flux sanguin et de l'apport en oxygène. L'alimentation sanguine insuffisante au cours d'un exercice intense, suivie par un retour à la normale durant la récupération, entraîne la production de radicaux libres (cf. ischémie*). Ainsi, un radical libre se définit comme une molécule ou un atome ne contenant qu'un seul électron sur son orbitale externe.

Chez l'homme, la production de radicaux libres par les neutrophiles (cellules phagocytaires) est observée durant un exercice exhaustif sur tapis roulant (vitesse de 13 à 20km/h en 13min, avec une pente de 4°) (Suzuki *et al.*, 1996). La production excessive de radicaux libres semble être le mécanisme qui déclenche l'apoptose lors d'un exercice intensif excentrique (Azenabor & Hoffman-Goetz, 1999).

Par ailleurs, chez l'homme la VO_2 et la sollicitation lors d'un travail excentrique sont plus basses par rapport au travail concentrique. Ainsi, de manière générale, il est connu que le stress oxydant métabolique a une forte tendance à former des radicaux libres issus de la

molécule d'oxygène. La production accrue de radicaux libres lors d'un exercice d'intensité élevée est dû essentiellement à l'augmentation de la consommation d'oxygène (Reid & Durham, 2002). Cependant, Jackson rapporte que la formation de radicaux libres mitochondriaux est plus élevée lors de contractions isométriques et concentriques comparées aux contractions excentriques (Jackson 2000 in Reid, Durham, 2002). Cette observation est en relation étroite avec une consommation plus basse d'oxygène enregistrée lors d'exercices excentriques. L'augmentation de radicaux libres résulte d'une accélération du cycle de Krebs et par conséquent d'une augmentation du nombre de donneurs d'électrons (NADH et FADH₂) ce qui génère un potentiel de membrane très élevé qui a pour conséquence d'inhiber le transport des électrons au niveau du complexe III de la chaîne de la respiration mitochondriale. Une part plus importante de l'O₂ qui arrive dans la mitochondrie est alors réduite en ion superoxyde.

Toutefois, il est très probable que le niveau de stress oxydant, en activant le coactivateur PGC1 α , module les facteurs contrôlant la biogenèse mitochondriale. De plus, il est admis que l'activité physique permet également d'activer les enzymes anti-oxydants (superoxyde dismutase (SOD), catalase glutathion peroxydase (GSHPx)) rendant ainsi les tissus plus résistants aux RLO.

Par ailleurs, il a été montré qu'en plus de la baisse de PO₂, un grand nombre de cytokines et de facteurs de croissance peuvent induire l'expression de Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) et des gènes cibles de HIF-1 α (Hathaway *et al.*, 2002). Paravicini et coll., (2002) ont montré que HIF-1 α régule une douzaine de gènes impliqués dans l'angiogenèse, l'érythropoïèse, le métabolisme énergétique et la survie cellulaire. Ainsi, chez la souris présentant une surexpression de ce facteur de transcription, l'hypertrophie du ventricule droit, l'augmentation de la pression ventriculaire droite, ainsi que l'épaississement de la média des artérioles pulmonaires induite par l'hypoxie, sont diminués (Azumi *et al.*, 1999). Cependant, chez l'homme, des analyses immunohistochimiques de lésions plexiformes d'HTAP sévères ont révélé une surexpression importante de HIF-1 α dans les cellules endothéliales proliférantes.

En résumé, il est connu que l'augmentation de radicaux libres altère les défenses naturelles de l'organisme et représente un risque pour la santé en augmentant le stress oxydant. Cependant, il est très probable que le niveau de stress oxydant en activant le

coactivateur PGC1 α module les facteurs contrôlant la biogenèse mitochondriale (mitohormèse). De plus, il est admis que l'activité physique permet également d'augmenter les enzymes anti-oxydantes dont leur fonction est le tamponnage des radicaux libres dangereux. Ainsi, l'augmentation des capacités anti-oxydantes après un entraînement physique rend les muscles plus résistants face au stress oxydant auquel ils peuvent être confrontés suite à un stress ou une maladie.

4.5. Les effets d'un exercice en descente et en montée sur les adaptations mitochondriales musculaires: un intérêt thérapeutique

4.5.1. Introduction

La sédentarité est clairement un facteur de risque cardio-vasculaire, c'est pourquoi il est essentiel de mieux comprendre les problèmes engendrés par ce déficit chronique d'activité physique. Le muscle squelettique est un élément essentiel dans l'ensemble des structures qui assurent le mouvement et la locomotion. Il se caractérise par sa complexité et par l'importante diversité de ses éléments constitutifs. C'est également un tissu susceptible de présenter des signes de désadaptation et de déconditionnement en réponse à certaines pathologies telle l'insuffisance cardiaque. En effet, un grand nombre d'équipes se sont intéressées aux mécanismes cellulaires à l'origine des atteintes musculaires, cardiaques et squelettiques dans diverses pathologies cardiovasculaires et métaboliques. Il semble alors de manière générale, que la baisse d'enzymes antioxydants dans les muscles de patients malades induit une hausse des radicaux libres oxygénés, ayant un effet délétère sur les muscles cardiaques et squelettiques (Perros & Humbert, 2007). Traditionnellement, il est conseillé de limiter l'exercice physique intense, réputé pour avoir un effet délétère sur l'évolution des maladies cardiovasculaires et respiratoires (tels que l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) par exemple)) en augmentant la post-charge à un cœur déjà pathologique (Badesch *et al*, 2004). Toutefois, les recommandations publiées ces dernières années (Galiè *et al.*, 2009) autorisent l'activité physique dans les limites d'une dyspnée (essoufflement à l'exercice) modérée. Toutefois, à notre connaissance, la grande majorité des études concernant l'entraînement physique et maladies cardiovasculaires a été réalisée en mode concentrique sur tapis roulant (sans pente), sollicitant grandement les fonctions cardiaque et respiratoire nécessitant donc une forte consommation en oxygène. L'objectif de cette thèse est de mettre en lumière le concept du « mitohormesis », responsable de différentes adaptations mitochondriales dans le

muscle squelettique. En effet, certains stimuli/activateurs (exercice, agents pharmacologiques, etc.) entraînent dans le muscle squelettique une augmentation modérée de radicaux libres, activant le système antioxydant permettant ensuite l'activation de voies de signalisation menant à la biogenèse mitochondriale avec une amélioration des capacités oxydatives musculaires. Dans la première partie de cette thèse, nous essayons de démontrer chez le rat, que pour une même puissance mécanique, la consommation en oxygène est plus faible au cours d'un exercice en descente (plutôt excentrique=étirement du muscle lors de la contraction) avec donc une moindre sollicitation du système cardiorespiratoire, pouvant être avantageuse chez des patients présentant des pathologies ayant une forte limitation à l'exercice. En proposant l'alternative de l'exercice en descente, nous espérons pouvoir suffisamment améliorer les fonctions cardiovasculaire et respiratoire et de minimiser le déconditionnement musculaire limitant les complications liées aux pathologies et d'améliorer ainsi leur qualité de vie.

4.5.2. L'exercice en montée

Lors de l'exercice en montée, on parle également très souvent d'action concentrique. En effet, lorsque le muscle se contracte et se raccourcit, les insertions se rapprochent et le muscle "se concentre" (voir [figure 20](#)). L'exercice en mode concentrique permet, entre autre, l'activation de PGC1 α (cf. chapitre précédent) et donc la biogenèse mitochondriale mais aussi l'augmentation d'enzymes anti-oxydants (superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxydase (GPX)). De plus, cette modalité d'exercice favorise l'utilisation du glucose par les cellules, la lipolyse et inhibe la néoglucogénèse réduisant ainsi la glycémie, intéressant dans le cas du diabète.

Il a été montré que pour une même puissance mécanique la consommation en oxygène est plus faible au cours d'un exercice excentrique (ex : descente d'une pente) vs concentrique, avec donc une moindre sollicitation du système cardiovasculaire qui serait avantageuse chez des patients présentant des pathologies avancées. En effet, il apparaît que le stress cardiovasculaire et métabolique est objectivement plus important, à même niveau réel d'effort, avec un exercice concentrique comparativement à un excentrique en termes de douleurs musculaires, d'élévation de la lactatémie et du volume plasmatique ($-11,4 \pm 1,3\%$ pour un exercice CON simple, $-4,6 \pm 0,3\%$ pour un multi-exercice CON vs. $-1,6 \pm 1,6\%$ pour un exercice EXC simple et $-1,2 \pm 1,2\%$ pour un multi-exercice EXC) (Durand *et al.*, 2003). Ils montrent également que chez des sujets âgés les contractions musculaires des membres

inférieurs en mode concentrique sollicitent beaucoup plus le système cardiorespiratoire que des contractions en mode excentrique à intensité identique. Cependant, il est connu qu'un travail en concentrique élève de façon plus intense la consommation d'oxygène qu'un exercice en excentrique. Toutefois, on observe une baisse du taux au repos de catécholamines (adrénaline et noradrénaline, déclenchées par le système nerveux sympathique) et une concentration plus élevée d'acétylcholine (produit du système vagotonique) au bout de quelques semaines d'entraînement en concentrique. Ce qui a pour conséquence de réduire notablement la sensibilité du cœur aux stimuli adrénérgiques agissant sur le rythme cardiaque.

4.5.3. L'exercice en descente

Lors de l'exercice en descente, on parle également très souvent d'action excentrique. En effet, lorsque le muscle se contracte en s'allongeant, les insertions s'éloignent et elles "s'excentrent". Il s'agit souvent de freiner une charge (voir figure 20).

Le travail musculaire excentrique se définit par l'association d'une contraction musculaire avec un allongement du complexe musculo-tendineux. Il est également dénommé travail négatif en opposition au travail musculaire concentrique utilisé lors du geste effecteur du mouvement. L'attention a été attirée sur la faible dépense énergétique correspondant au travail musculaire excentrique par rapport au travail concentrique (Asmussen, 1953), avec pour hypothèse d'explication un moindre recrutement spatial des motoneurones à niveau de force identique.

Le renforcement du tissu conjonctif et l'évolution de la viscosité du muscle en raison du changement de la température locale ont également été proposés comme facteurs explicatifs. Knuttgen *et al.* (Knuttgen *et al.*, 1982) ont déterminé que la consommation d'oxygène diminuait de 70 à 75 % pour un travail excentrique comparable aux mêmes valeurs de travail concentrique. Davies et Barnes (Davies & Barnes, 1972) ont fait des observations semblables selon lesquelles la marche en descente, à un même niveau d'intensité qu'en concentrique, demandait seulement 20% de la consommation d'oxygène

Le travail musculaire freinateur excentrique intervient dans la phase d'amortissement des sauts et dans l'exécution des mouvements de démarrage. Il est caractérisé par une contraction musculaire sans raccourcissement des fibres. Quant à l'exemple de la course sur

tapis roulant, la contraction excentrique peut être reproduite lors d'une simulation de pente négative (course en descente). Les ischiojambiers prennent le rôle du freinateur.

Il est aujourd'hui clairement admis que l'exercice excentrique induit indéniablement un stress mécanique (Proske & Morgan, 2001). En effet, il est connu que les lésions musculaires dues à la contraction en excentrique surviennent préférentiellement à l'issue des exercices ayant une composante excentrique importante. Or, pour ce mode de contraction le pic de force correspond à une longueur de sarcomère supérieure à celle correspondant au plus grand nombre de ponts d'actine-myosine. Ainsi, une force plus importante appliquée sur chaque pont actine-myosine pourrait bien être à l'origine des lésions de l'exercice. Une deuxième hypothèse laisse penser que la capacité d'étirement du sarcomère limite l'action et cause des lésions importantes. En effet, certains sarcomères se trouveraient ainsi étirés au-delà de la résistance des structures élastiques de la fibre, ce qui serait à l'origine de la rupture du sarcolemme (Ogilvie *et al.*, 1988).

Toutefois, l'habitué progressive à ce genre d'exercice permet d'observer une diminution progressive des lésions musculaires. En effet, selon Gibala *et al.* (Gibala *et al.*, 2000) le nombre de fibres musculaires lésées est plus limité chez l'haltérophile après entraînement régulier (contractions excentriques du biceps).

Il a été démontré que la puissance développée au cours d'un test d'effort maximal à l'issue d'un entraînement excentrique était supérieure avec une consommation d'oxygène moindre, comparativement à l'entraînement concentrique, avec un même niveau du débit cardiaque et des résistances périphériques (Dufour *et al.*, 2007). Pour une même charge, les contractions excentriques sont supérieures d'environ 50 % en puissance par rapport aux contractions concentriques. Pour cette même raison une mise en place d'exercices excentriques en vue d'une réadaptation et amélioration des capacités physiques chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires un moindre coût bioénergétique peut paraître pertinente.

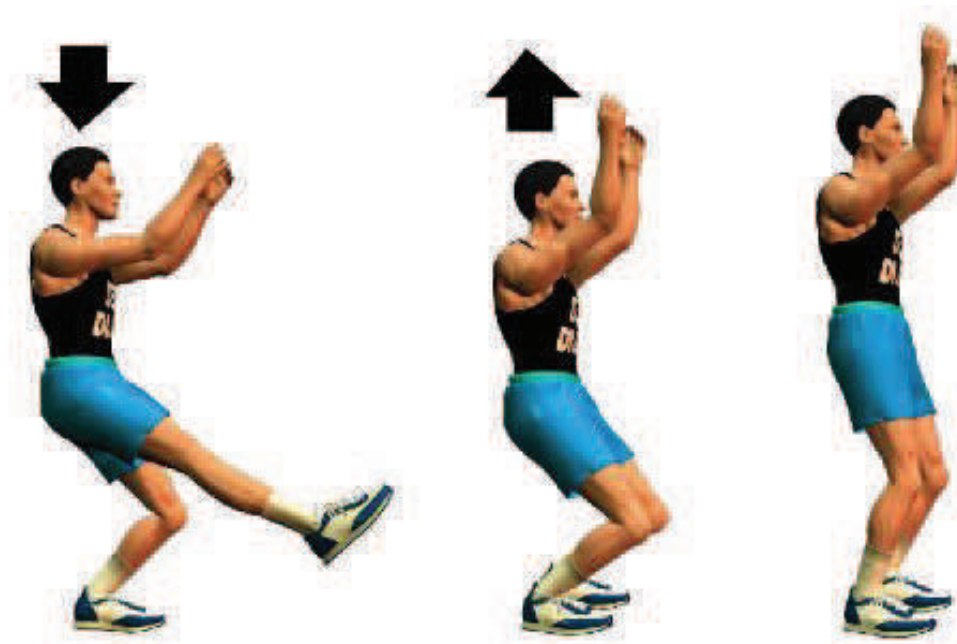


Fig 20. Contractions musculaires en excentrique et concentrique. Descente sur une jambe (excentrique) montée sur 2 jambes (concentrique), En excentrique, les ischiojambiers prennent le rôle du freinateur.

En résumé, l'entraînement en endurance permet le développement de la performance aérobie en modifiant les paramètres centraux et périphériques. Ces effets bénéfiques sont recherchés dans le cadre de la réhabilitation des maladies chroniques par la pratique de l'activité physique. Selon les caractéristiques de l'entraînement, les effets sont plus ou moins marqués et améliorent les paramètres centraux et/ou périphériques. Les adaptations induites par la programmation des charges d'entraînement au cours de la séance ne sont pas clairement établies. Il a été montré que l'entraînement physique dans des maladies cardiovasculaires et respiratoires est un complément prometteur à un traitement médical, améliorant considérablement la capacité à l'exercice et la qualité de vie des patients. Les effets bénéfiques de l'exercice pourraient être en partie liés à la réduction du niveau du stress oxydant. La pratique régulière d'un exercice modérément intense peut favoriser la biogenèse mitochondriale, améliorer les capacités anti-oxydantes, et donc protéger la fonction mitochondriale musculaire cardiaque et périphérique dans ces pathologies. Toutefois, l'exercice concentrique sollicite grandement les fonctions cardiorespiratoires chez ces patients présentant de fortes limites cardiaques. Nous proposons donc d'évaluer les effets d'exercice excentrique sollicitant moins cette fonction cardiaque pour une puissance de travail identique, ce qui pourrait être intéressant pour certains types de patients. Nous testerons ce type d'exercice dans un premier temps chez

l'animal afin de mieux caractériser à la fois la cinétique de VO₂max mais également la fonction mitochondriale, en fonction de l'intensité d'exercice en descente.

5. PRÉCONDITIONNEMENT PAR L'EXERCICE PHYSIQUE DANS L'ISCHÉMIE-REPERFUSION

L'objet principal de nos travaux est de mettre en lumière le concept du « mitohormesis », responsable de plusieurs adaptations mitochondriales dans le muscle squelettique. Les chapitres précédents nous ont montré que certains stimuli/activateurs (exercice, agents pharmacologiques, etc.) entraînent dans le muscle squelettique une augmentation modérée de radicaux libres, activant le système antioxydant permettant ensuite l'activation de voies de signalisation menant à la biogenèse mitochondriale avec une amélioration des capacités oxydatives musculaires. Dans notre équipe, une grande partie de nos recherches est axée à la fois sur l'étude des effets hormétiques de différents protocoles de préconditionnement ainsi que sur l'étude du phénomène d'ischémie-reperfusion du muscle squelettique. Dans notre dernière étude, nous nous sommes proposé d'étudier les mécanismes physiologiques permettant l'activation et la protection potentielle de la fonction mitochondriale du muscle squelettique lors d'une période d'ischémie-reperfusion.

5.1. L'ischémie-reperfusion du muscle squelettique

L'ischémie musculaire squelettique est souvent la conséquence de l'interruption de la circulation sanguine au niveau du territoire musculaire concerné, ce qui prive les différents tissus de l'apport en oxygène et en éléments nutritifs. Ceci va entraîner la consommation de l'oxygène en réserve sur la myoglobine, donc le passage à un métabolisme en anaérobie ; par la suite, et à cause de l'interruption du débit sanguin et l'absence du drainage, une accumulation des produits du métabolisme se produit. L'interruption du circuit de la circulation sanguine peut se produire au niveau artériel, veineux, ou artério-veineux. Notre exposé s'intéresse à l'obstruction artérielle. L'origine de l'ischémie peut-être : un processus pathologique (embolie artérielle, thrombose artérielle aiguë par rupture de plaque d'athérome), secondaire à un évènement externe (compression artérielle extrinsèque suite à un processus tumoral ou bien à un accident traumatique), iatrogène (clampage artériel lors d'une intervention en chirurgie vasculaire ou cardiaque, transfert de lambeaux musculo-cutanés lors

d'une intervention de chirurgie réparatrice, ou bien prélèvement pour une transplantation d'organe ou de membre). Les conséquences varient selon la durée de l'ischémie.

5.2. Lésions d'ischémie-reperfusion

Les lésions ischémiques pures, non associées à des lésions de reperfusion, n'ont pas été étudiées au niveau du muscle squelettique. Par contre, Reimer *et al.* ont montré au niveau du myocarde de chien, l'existence du « Wavefront phenomenon » ou « phénomène d'onde de progression ischémique ». Il s'agit de l'apparition de dégâts nécrotiques musculaires proportionnels à la durée d'ischémie (Reimer *et al.*, 1977). Au niveau du muscle squelettique, la question a été étudiée en effectuant différents temps d'ischémie au niveau de plusieurs groupes musculaires avec un délai constant de reperfusion. Ainsi, Martou *et al.* (Martou *et al.*, 2006) ont montré sur le muscle squelettique humain *in vitro*, dans un modèle de temps d'ischémie variable suivi de 2 heures de reperfusion, que la viabilité musculaire squelettique commence à être significativement altérée à partir de la troisième heure d'ischémie ($50,1 \pm 5,5\%$ de viabilité) et que l'altération s'est aggravée avec la prolongation de la durée de l'ischémie ($18,8 \pm 3,6\%$ de viabilité après six heures d'ischémie). Au cours des phases précoces de l'ischémie, l'ATP est générée par la glycolyse (Khalil *et al.*, 2006). Il s'en suit une déplétion des réserves en glycogène, un métabolisme en anaérobic, et une acidose lactique locale (Norwood *et al.*, 2004). La déplétion en ATP qui en résulte réduit la fonction de la membrane cellulaire et provoque un œdème cellulaire. En effet, la cellule va essayer de corriger l'acidose à travers l'échangeur Na^+/H^+ , le cytoplasme va donc être saturé en ions Na^+ , provoquant un appel osmotique vers le cytoplasme. Ceci est aggravé par le fait que l'échangeur Na^+/K^+ (ATP-dépendant) devient non fonctionnel par manque d'ATP. Par la suite, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ s'active dans son mode inverse pour épurer les ions Na^+ du cytosol, au détriment de l'entrée d'ions Ca^{2+} . L'ischémie prolongée va résulter en une accumulation accrue des ions Na^+ et Ca^{2+} au niveau du cytosol (Cour *et al.*, 2011). L'acidose et l'accumulation de produits métaboliques toxiques vont activer des médiateurs chimiques et enzymatiques, incluant la phospholipase A2 et les lysozymes. La phospholipase A2 va métaboliser les phospholipides membranaires en acide arachidonique, un précurseur des médiateurs de l'inflammation, comme les leukotriènes et les prostaglandines, et donc entraîner un chimiotactisme leucocytaire (Khalil *et al.*, 2006). Les lysozymes, eux, vont

digérer les cellules nécrotiques. L'ischémie va également provoquer la production de cytokines, l'activation des kinines, du complément, et des voies de coagulation (voir figure 21).

L'ischémie pure a provoqué une altération importante de la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale des muscles squelettique chez le rat comme il a été démontré dans les travaux de Brandão *et al.* (Brandão *et al.*, 2003) et de Thaveau *et al.* (Thaveau *et al.*, 2007).

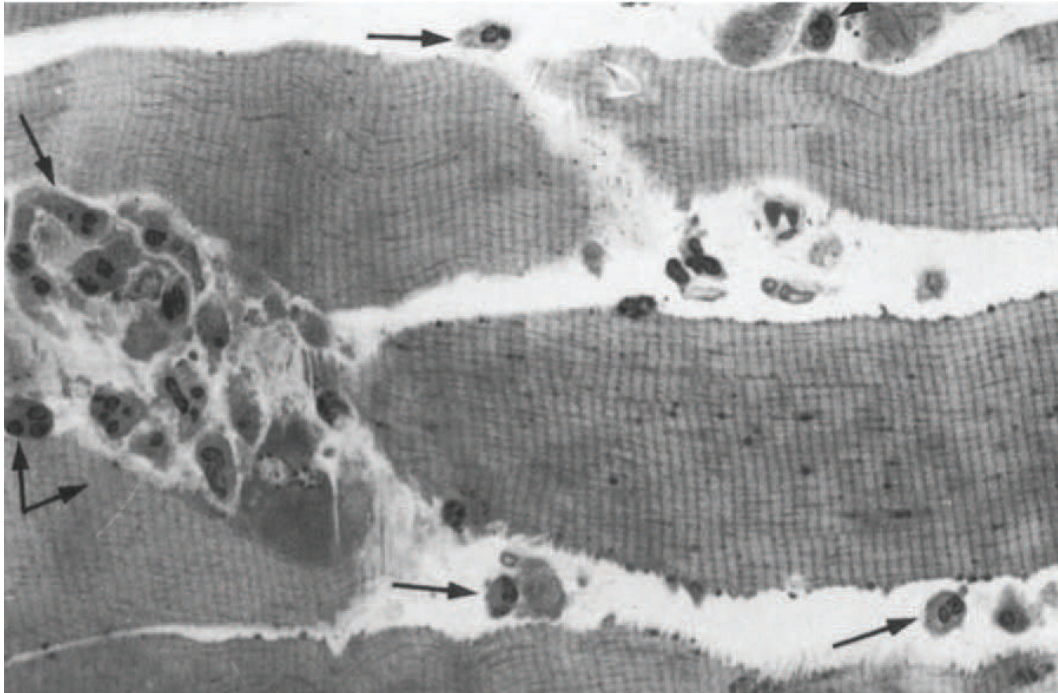


Figure 21 : Coupe histologique d'un muscle squelettique humain en ischémie. Les flèches indiquent les granulocytes infiltrant le tissu musculaire pendant une chirurgie de l'aorte abdominale (Magnification x 700) (d'après Formigli *et al.*, 1992).

Quant à la reperfusion du muscle squelettique, étant donné que les lésions d'ischémie se majorent avec la durée de l'ischémie, il a été proposé d'arrêter les effets délétères de l'ischémie avant un stade irréversible où toute intervention devient inutile. La diminution du temps de clampage artériel dans un contexte chirurgical est donc devenue très importante, et la reperfusion lors d'un événement ischémique aigu s'est rapidement imposée. Jennings et Reimer en 1983 (Jennings & Reimer, 1983), ont montré au niveau du myocarde l'intérêt de la reperfusion en termes de limitation lésionnelle. Depuis, les méthodes de reperfusion se sont multipliées (revascularisation médicale, chirurgicale, percutanée, déclampage précoce, réimplantations précoces, etc.), restant le seul moyen efficace pour lutter contre les lésions ischémiques.

La reperfusion elle-même s'accompagne d'une majoration de l'altération tissulaire, par des mécanismes multiples et variés, plus ou moins bien connus (voir figure 22).

Les lésions de reperfusion ont été étudiées pour la première fois au niveau du myocarde de chien par Cerra *et al.* en 1975 (Cerra *et al.*, 1975). Ils ont découvert que la restauration du flux sanguin était accompagnée d'une nécrose hémorragique sous-endothéliale.

Au niveau cellulaire, certes la réoxygénation va arrêter les lésions induites par l'ischémie, mais elle va provoquer une série de lésions induites par la reperfusion. Au niveau mitochondrial, notre équipe (Charles *et al.*, 2011) a démontré que la chaîne respiratoire de muscle squelettique de rat a été atteinte par la reperfusion. La réoxygénation va tout de même générer un potentiel membranaire mitochondrial impliquant la synthèse de l'ATP, provoquant une surcharge cytosolique du Ca^{++} , et par conséquent une accumulation du Ca^{++} dans la matrice mitochondriale, responsable des dépôts calciques (Formigli *et al.*, 1992)

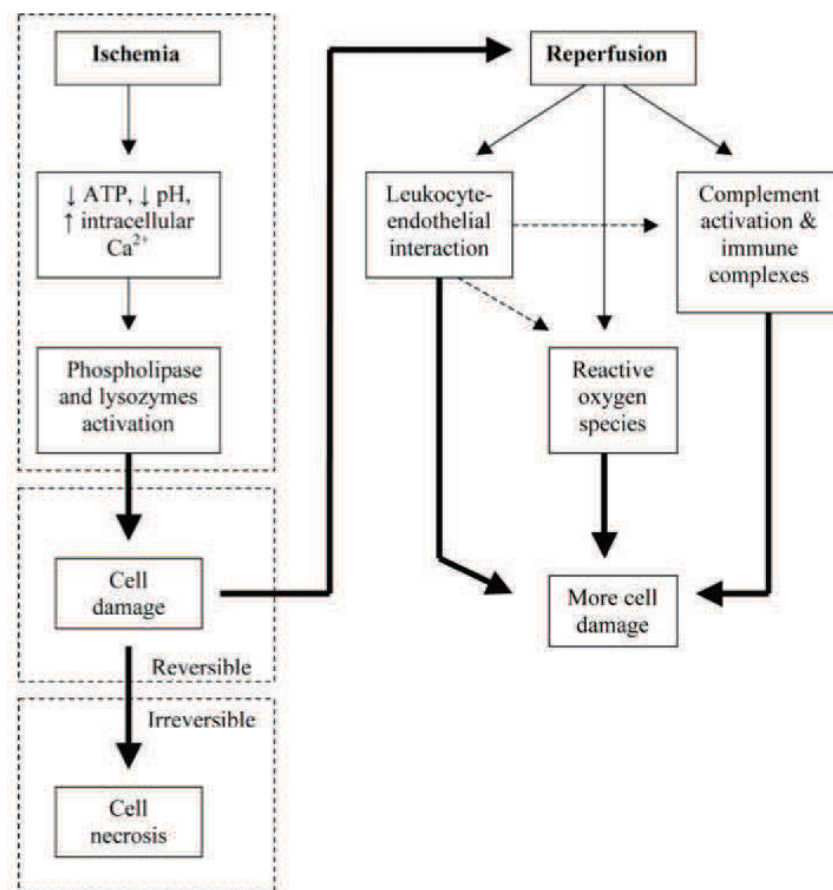


Figure 22 : Séquence des événements survenant pendant l'ischémie reperfusion (d'après Khalil *et al.*, 2006).

La réoxygénation va provoquer également la production massive de RLO (Thompson *et al.*, 1996; Cour *et al.*, 2011). Lors de la reperfusion, la xanthine oxydase produite pendant l'ischémie va catalyser la formation d'acide urique à partir de l'hypoxanthine, accompagnée de la formation de grandes quantités de RLO. Les RLO ainsi produits vont dépasser les défenses anti-oxydatives cellulaires, entraînant la peroxydation des acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire et des lésions tissulaires locales. La peroxydation des lipides est accompagnée de l'activation du complément, la libération d'acide arachidonique et la synthèse accrue des molécules d'adhésion endothéliale. Grisotto *et al.* (Grisotto *et al.*, 2000) ont montré au niveau des cellules musculaires squelettiques de rat que trois heures d'ischémie suivies de 45 minutes de reperfusion, ont augmenté les taux de glutathion oxydé et de malondialdéhyde, témoignant de la présence accrue de RLO et de la présence de lésions au niveau de la membrane cellulaire. L'activation leucocytaire et la dysfonction microvasculaire surviennent alors.

5.3. Protection mitochondriale

5.3.1. Découverte du concept de préconditionnement ischémique dans le muscle squelettique

La reperfusion après un évènement ischémique s'avère être le seul moyen efficace pour lutter contre les lésions secondaires à l'ischémie. La reperfusion elle-même génère des lésions supplémentaires. Si la reperfusion est effectuée avant que les lésions ischémiques n'aient atteint un stade irréversible, l'étendue de la nécrose reste moins importante qu'en l'absence de reperfusion.

Depuis que ce concept a été accepté, il est devenu important de chercher des moyens de prévention à la fois des lésions ischémiques et des lésions de reperfusion. Deux moyens de prévention, nommés techniques de conditionnement, ont été développés : le conditionnement ischémique et le conditionnement pharmacologique.

Le conditionnement ischémique clinique lutte contre ces deux types de lésions, il consiste à effectuer plusieurs cycles de brèves périodes d'ischémie suivies de brèves périodes de reperfusion, au niveau du territoire ischémique concerné (conditionnement local) ou bien à distance de celui-ci (conditionnement à distance). Différents types de conditionnements ischémiques ont été décrits, selon le moment où le conditionnement ischémique est pratiqué par rapport à l'évènement ischémique (pré, per, ou postconditionnement). Chaque type de

conditionnement ischémique possède un mode d'action sensiblement différent de l'autre, avec plusieurs voies de signalisation communes. La technique de préconditionnement ischémique a été décrite pour la première fois par Murry *et al.* en 1986 sur un modèle canin d'ischémie du myocarde (Murry *et al.*, 1986). Le perconditionnement ischémique consiste à effectuer une série de cycles de courte durée d'ischémie et de reperfusion avant la survenue de l'ischémie. Dans l'étude originale de Murry *et al.* la réalisation de 4 cycles de 5 minutes d'ischémie et de 5 minutes de reperfusion au niveau de l'artère coronaire interventriculaire antérieure a permis de diminuer de 25% de la taille de la nécrose après 40 minutes d'ischémie (réalisée juste après la fin du préconditionnement par l'occlusion de l'artère coronaire interventriculaire antérieure) et 4 jours de reperfusion par rapport au groupe témoin.

Le conditionnement pharmacologique repose sur l'administration d'un agent pharmacologique pendant, avant ou après l'ischémie pour prévenir l'apparition des lésions d'ischémie reperfusion. Différents agents ont été développés et possèdent chacun des mécanismes d'action qui leur sont propres.

5.3.2. Mécanismes protecteurs du préconditionnement

Des effecteurs sont à la fin de la chaîne du préconditionnement, nous citons les plus importants: les canaux mitochondriaux K^+ -ATP dépendants (mKATP) et les pores de transition de perméabilité mitochondriaux (mPTP).

- Les canaux mitochondriaux K^+ -ATP dépendants (mKATP)

Ces canaux potassiques se trouvent sur la membrane du réticulum sarcoplasmique et sur la membrane mitochondriale ; ils sont inhibés par des taux physiologiques d'ATP, d'où le terme ATP-dépendants (Yamashita *et al.*, 1999)(Yellon & Downey, 2003). Ils sont également réactifs à plusieurs facteurs comme le pH, les acides gras, le NO, etc. La mitochondrie produit de l'ATP en permettant aux ions H^+ de traverser de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale à travers l'ATP synthase, ainsi phosphorylant l'ADP en ATP. L'entrée de l'ion H^+ par les canaux mKATP va court-circuiter l'ATP synthase et diminuer la production d'ATP. La protection par le biais des canaux mKATP est probablement due à l'entrée des ions H^+ . Donc, les mitochondries deviennent plus résistantes à l'entrée des ions Ca^{2+} (Wang *et al.*, 2001), ce qui prévient les effets néfastes de ce dernier. Plusieurs moyens

pharmacologiques pouvant ouvrir ou fermer les canaux mKATP ont été incriminés dans la protection contre l'ischémie-reperfusion, et par conséquent promouvoir ou éliminer l'effet protecteur du préconditionnement.

5.3.3. Effet protecteur de l'exercice aigu

Notre équipe travaille constamment sur de nouveaux concepts de préconditionnement lors du phénomène d'ischémie-reperfusion du muscle squelettique. Nous nous intéressons particulièrement à leurs répercussions sur le muscle squelettique, le stress oxydant et la mitochondrie. Plusieurs publications de notre équipe ont démontré l'effet protecteur d'un préconditionnement à distance avant une ischémie-reperfusion (Mansour *et al.*, 2012; Talha *et al.*, 2013; Guillot *et al.*, 2013). Il nous semblait donc important de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique consistant à mettre en place un modèle d'exercice comme préconditionnement juste avant une période d'ischémie-reperfusion. L'objectif étant d'étudier les mécanismes physiologiques permettant l'activation et la protection potentielle de la fonction mitochondriale du muscle squelettique. Pour rappel, au niveau des cellules musculaires, l'ischémie-reperfusion (I-R) est caractérisée par l'association d'une production de radicaux libres, une atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale et une activation de l'inflammation.

Au niveau cardiaque, il a été démontré une diminution des atteintes mitochondriales suite à une période d'I-R, en effectuant des entraînements physiques de plusieurs jours (Lee *et al.*, 2012). Cependant, l'effet protecteur « pré-conditionneur » d'un exercice aigu n'a jamais été démontré au niveau du muscle squelettique. L'objectif de la dernière partie de ma thèse est ainsi de mettre en place un nouveau modèle de préconditionnement et de montrer l'effet protecteur d'un exercice de 30min sur le muscle squelettique via une "pré-activation" mitochondriale. En effet, quelques études s'intéressant sur l'effet bénéfique d'un entraînement physique sur le métabolisme, ont pu constater une induction du stress métabolique (épuisement des stocks d'ATP, la déplétion en glycogène, augmentation du stress oxydant modéré) après exercice, caractéristique d'un effet hormétique. D'autre part, au niveau cardiaque, certains auteurs ont observé une augmentation de l'activité de MnSOD via certaines cytokines (IL-6 et TNF-alpha) (Yamashita *et al.*, 1999), une activation du canal mito-K(ATP) (Quindry *et al.*, 2012), l'activation des "heat shock proteins" (HSP72), ainsi qu'une augmentation du stress oxydant, modifiant certaines protéines et stimulant l'activité des enzymes antioxydants. Au final, nous nous attendons à une protection de la chaîne

respiratoire mitochondriale avec une diminution du stress oxydant via une “pré-activation” métabolique.

En résumé, L'ischémie-reperfusion du muscle squelettique se caractérise au niveau musculaire par une dysfonction mitochondriale, une production de RLO, et une activation de l'inflammation. Cette atteinte locale peut être associée à une atteinte systémique pouvant entraîner une défaillance d'organes multiples. Cependant, au niveau cardiaque, il a été démontré une diminution des atteintes mitochondriales suite à une période d'I-R, en effectuant des entraînements physique de plusieurs jours. En effet, l'exercice est connu comme un puissant activateur métabolique, en stimulant l'activité de plusieurs protéines et enzymes, impliqués dans la protection musculaire. L'objectif de cette thèse est de mettre en évidence une protection de la chaîne respiratoire mitochondriale avec une diminution du stress oxydant via un préconditionnement par un exercice aigu.

OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

PROBLÉMATIQUES

Notre laboratoire étudie le fonctionnement de la mitochondrie musculaire dans différents modèles de maladies cardiovasculaires et métaboliques ainsi que lors de protocoles d'entraînement physique. Nous travaillons à la fois chez les patients, sur des modèles animaux ainsi que sur cellules en culture.

La sédentarité est clairement un facteur de risque cardio-vasculaire, c'est pourquoi il est essentiel de mieux comprendre les problèmes engendrés par ce déficit chronique d'activité physique. Le muscle squelettique est un élément essentiel dans l'ensemble des structures qui assurent le mouvement et la locomotion. Il se caractérise par sa complexité et par l'importante diversité de ses éléments constitutifs. C'est donc un tissu susceptible de présenter des symptômes de mauvaise adaptation voire de déconditionnement en réponse à la sédentarité, mais également et surtout en réponses à certaines pathologies telles que l'insuffisance cardiaque, au cours de laquelle des anomalies intrinsèques des muscles squelettiques ont été mises en évidence.

Nos hypothèses de travail nous amènent à penser que le métabolisme énergétique musculaire serait altéré *via* un dysfonctionnement mitochondrial et que ce phénomène serait une étape clef de ces atteintes périphériques. En effet, si l'atteinte centrale est multifactorielle, l'atteinte musculaire peut être considérée comme une voie finale commune. En accord avec ce postulat, l'OMS précise que les maladies chroniques ne sont pas seulement caractérisées par les troubles primaires mais également par les infirmités qui en découlent. Cette définition s'applique parfaitement aux patients que nous prenons en charge quotidiennement dans notre service et qui sont atteints d'insuffisance cardio-respiratoire, d'artériopathie des membres inférieurs, de diabète, etc... Il semble que de manière générale, la baisse du nombre de mitochondries, associée à une diminution des défenses anti-oxydantes, participe à la spirale de déconditionnement et au développement d'une véritable myopathie métabolique musculaire.

Les mécanismes impliqués dans ces atteintes sont nombreux et encore mal connus. Néanmoins, il apparaît que le stress oxydant joue un rôle majeur dans les dysfonctions mitochondriales. Une augmentation de la production des radicaux libres de l'oxygène (RLO) n'a cependant pas qu'un effet délétère. En effet, une augmentation modérée de la production

de RLO (en quantité et/ou en durée) présente un effet bénéfique en stimulant les défenses anti-oxydantes de la cellule et la biogenèse mitochondriale, c'est ce que l'on appelle le phénomène d'hormèse mitochondriale. Dans le laboratoire, nous avons pu étayer ce concept sur différents modèles (cellulaires, animaux et humains) suite à la prise de statines, qui a pour conséquence d'augmenter la production de RLO de façon différente en fonction du type de muscle. De façon plus générale, un stress plus ou moins important (exercice, découplage pharmacologique, ischémie-reperfusion) pourrait permettre la mise en place d'adaptations mitochondriales, à condition que le stress ne dépasse pas un seuil à partir duquel il va avoir des effets délétères pour le muscle squelettique.

L'exercice physique est un bon moyen pour empêcher le déconditionnement musculaire et il est reconnu pour être bénéfique dans un nombre important de maladies chroniques, notamment en provoquant un stress métabolique qui peut s'apparenter au phénomène d'hormèse mitochondriale. Néanmoins, les effets bénéfiques de l'exercice physique restent controversés dans des pathologies respiratoires et/ou cardiaques sévères telles que l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). En effet, l'exercice va augmenter la post-charge à un cœur déjà pathologique. Toutefois, les recommandations publiées ces dernières années (Galiè *et al.*, 2009) autorisent l'activité physique dans les limites d'une dyspnée (essoufflement à l'exercice) modérée. En effet, il est actuellement connu qu'un entraînement à base d'exercices excentriques permet de majorer les stimuli mécaniques tout en minimisant les stimuli métaboliques. C'est pourquoi nous nous sommes tout particulièrement intéressés à ce type d'exercice.

A l'aide de différents modèles animaux, nous nous proposons d'essayer de mieux comprendre les adaptations mitochondriales en réponses à différents types de stress (aigus ou chroniques). Le but étant de mieux comprendre pourquoi et comment la modulation de la fonction mitochondriale, par un stimulus de type "hormèse mitochondriale", pourrait être un bon moyen thérapeutique pour lutter contre les agressions auxquelles est confronté le muscle squelettique au cours du développement de différents types de pathologies chroniques. C'est dans cet esprit que nous avons réalisé trois études différentes qui constituent les trois parties de ma thèse.

La première partie de cette thèse a été principalement consacrée au développement d'un nouveau système d'analyse de la consommation d'oxygène chez le rat dans deux types d'exercices physiques différents effectués sur tapis roulant (exercice en montée versus exercice en descente). Les systèmes de mesure de VO_2 qui sont proposés sur le marché pour les rongeurs ne correspondent pas à la réalité retrouvée chez l'homme. Ainsi nous avons développé, avec l'aide d'un ingénieur, un modèle de masque, proche de celui utilisé chez l'homme. L'objectif était de valider cette mesure de VO_2 ainsi que d'enregistrer la cinétique de VO_2 lors d'un test triangulaire sur tapis de roulant chez le rat. Nous avons pu ainsi démontrer que la consommation en oxygène était plus faible au cours d'un exercice en descente (contraction plutôt excentrique avec un étirement du muscle lors de la contraction) avec donc une moindre sollicitation du système cardiorespiratoire à même puissance mécanique (même vitesse de course). Ce type d'entraînement en descente pourrait être avantageux, en provoquant un stress métabolique moins important, chez des patients ayant des pathologies avec une importante limitation à l'exercice suite à une limitation centrale. Nous avons également étudié la production de RLO et l'état de la fonction mitochondriale après ces deux types d'exercice réalisés à même vitesse, caractérisant la répercussion de ce stress métabolique (hormèse mitochondriale) suite à ces deux types d'exercice au niveau circulant et musculaire.

La deuxième partie de ma thèse consista à étudier les mécanismes physiologiques à l'origine des adaptations de la fonction mitochondriale du muscle squelettique. Il est clairement admis, dans la littérature, qu'une augmentation de la quantité de mitochondries dans le muscle améliore la capacité à l'exercice chez l'homme (Booth & Thomason, 1991; Zoll *et al.*, 2003). Les auteurs ont démontré une amélioration du couplage mitochondriale chez les athlètes (Walsh *et al.*, 2001; Zoll *et al.*, 2002, 2003). Cependant, l'effet d'une diminution du couplage mitochondrial sur les capacités à l'exercice et les adaptations mitochondriales reste encore inconnu. Ainsi, nous avons cherché à mieux comprendre en quoi un traitement pharmacologique, provoquant un stress métabolique important en découplant la mitochondrie, pouvait avoir des effets bénéfiques / délétères sur le métabolisme musculaire. Nous avons choisi le 2,4-dinitrophénol (DNP) pour ces propriétés d'activateur du métabolisme cellulaire, provoquant un découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Cette deuxième partie constitue la part la plus importante de mon travail de thèse.

La dernière partie de cette thèse a eu pour but de montrer si un exercice aigu pouvait déclencher le phénomène d'hormèse mitochondriale, permettant de protéger le muscle squelettique contre une agression de type ischémie-reperfusion. Le phénomène d'hormèse s'apparente ici à un protocole de préconditionnement par l'exercice physique. En effet, de façon similaire il est connu depuis plusieurs années que l'exercice physique, effectué de façon chronique ou en aigu, protège le cœur contre les effets délétère de l'ischémie-reperfusion. Cependant, l'effet protecteur « pré-conditionneur » d'un exercice aigu n'a jamais été démontré au niveau du muscle squelettique.

Pour conclure, pendant les trois années de thèse, et notamment à travers les trois grandes études, nous avons pu étudier plusieurs mécanismes physiologiques permettant de mieux comprendre les capacités d'adaptations de la fonction mitochondriale du muscle squelettique. Nous avons notamment montré que le déclenchement des mécanismes d'hormèse mitochondriale permettait d'améliorer et/ou protéger le potentiel métabolique cellulaire. Nos résultats ont été très concluants, nous permettant de proposer plusieurs nouvelles stratégies thérapeutiques, dans un premier temps chez l'animal, puis chez l'homme.

MATERIELS ET METHODES

1. PROTOCOLES *IN VIVO* DES TROIS ÉTUDES PRINCIPALES

1.1. Développement ou importation de nouvelles techniques au sein du laboratoire

1.1.1. Développement du modèle de mesure de la consommation d'oxygène avec masque chez le rat

Certaines mesures expérimentales rapportées dans ce travail de thèse ont nécessité l'importation ou le développement de nouvelles techniques au sein du laboratoire, notamment le développement d'un appareil de mesure de la consommation d'oxygène avec masque chez le rat, sa mise en œuvre et le développement du logiciel d'analyse.

Sur la base de ce qui se fait chez l'homme dans un service hospitalier d'explorations fonctionnelles, avec l'aide des compétences techniques de l'ingénieur biomédical de notre service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles (Jean Pierre Speich), un prototype de mesure de la consommation d'oxygène avec masque chez le rat a été développé au laboratoire (voir figure 23). Ma contribution a porté sur la mise au point finale du prototype, notamment celle des masques, de l'enregistrement des mesures et de l'application pratique de l'appareil sur le tapis roulant. Ce prototype a été adapté à partir d'un modèle publié pour la première fois en 1980 par Russel chez le rat. Nous l'avons validé avant de commencer notre première étude, sachant que le masque entraînerait une gêne dans la course du rat. Ces problèmes ont pu être réglés au fur et à mesure et nos valeurs sont comparables à celles retrouvées dans les études classiques. Notre appareil présente l'avantage d'enregistrer la consommation d'oxygène toute les 5 secondes de manière précise, du fait du faible volume du masque. Le débit envoyé dans le masque est donc relativement faible (de < 3l/min au repos à 5l/min à l'exercice seulement). Ce système est donc clairement plus précis que les modèles classiques de mesure (voir figure 23, boîtes hermétiques). Cependant, un seul animal à la fois peut être analysé, ce qui rallonge fortement le protocole du test triangulaire maximal lorsque nous analysons la VO_2 .

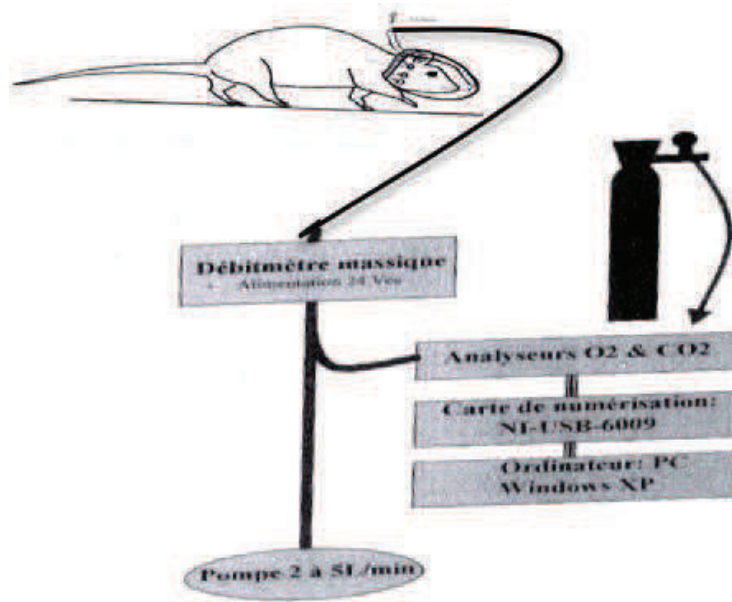


Figure 23. Schéma du modèle de mesure de la consommation d'oxygène avec masque chez le rat. Le masque en plastique est fixé à l'aide d'un élastique derrière les oreilles du rat. Un tuyau part de la sortie du masque vers un débitmètre massique. Une pompe permet d'envoyer de l'air (2-5L/min) dans le masque. Ensuite, l'analyseur d'O₂ et de CO₂ permet de mesurer les gaz expirés sortant. Ces données sont numérisées sur une carte (NI-USB-6009) et enregistrées sur ordinateur.

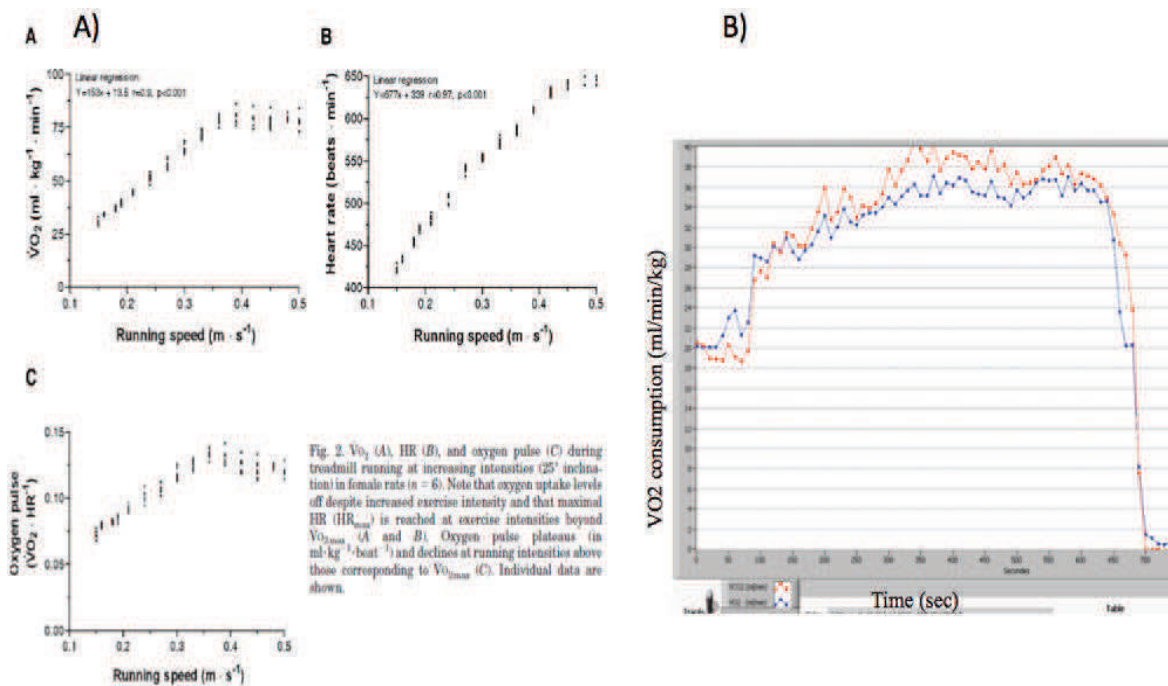


Figure 24. Comparaison de modèles de mesure de consommation d' O₂ classiques versus le modèle avec masque. Classiquement chez l'animal, le tapis de course est entouré par une chambre métabolique avec un volume >11l/min d'air. Les mesures sont alors très peu précises et surtout très

instables. Il faut environ 3-4 minutes pour avoir une valeur fiable de VO_2 (Wisløff *et al.*, 2001). B) Une capture d'écran de notre appareil montre l'enregistrement toutes les 10 secondes (min 5sec) de la consommation d'oxygène. Cela nous permet de travailler avec des paliers plus courts, d'avoir une vraie cinétique instantanée, plus proche de ce qui se fait chez l'homme.

1.1.2. Technique de mesure de la consommation d'oxygène chez le rat

Pour effectuer les mesures respiratoires, un masque a donc été fixé autour de la tête de chaque animal et a été maintenu en place avec un collier au repos et / ou lors de la course sur tapis roulant. Le débit d'air entrant est maintenue à 3 l/min, constant pour les mesures au repos, et 5 l/min lors de l'exercice sur le tapis roulant. La concentration de CO_2 et d' O_2 sortant a été surveillé en permanence avec un O_2 et CO_2 analyseur (Ergocard avec la version du logiciel Exp'Air 26/01/35, Medi-Soft, Dinant, Belgique). La température ambiante et la pression atmosphérique ont été enregistrées en continu, et les valeurs ont été corrigées par rapport aux valeurs de gaz standard STPD (standard température et pression barométrique,). Les signaux provenant des analyseurs de gaz ont été enregistrés par un logiciel, calculant la consommation d'oxygène (VO_2) et la sortie de dioxyde de carbone (VCO_2) (toutes les 10 secondes) en utilisant des équations standard d'échange de gaz. Les données métaboliques sont données en millilitres d' O_2 /C O_2 consommés/produits par minute par kilogramme.

1.1.2.1. Mesure de la consommation d'oxygène chez le rat au repos

Pour la mesure des échanges gazeux au repos, deux semaines avant de commencer l'expérience, les animaux ont été habitués au port du masque utilisé et placés dans une petite cage pour empêcher tout mouvement. Les échanges gazeux ont été calculés et moyennés sur une durée de 20 min. La température ambiante était de $20 \pm 2^\circ C$.

1.1.2.2. Mesure de la consommation d'oxygène chez le rat au cours du test triangulaire

Le modèle d'exercice est le même pour les trois études (la troisième a été réalisée sans masque et donc sans mesure de VO_2). Deux semaines avant le test triangulaire, les animaux ont été habitués à courir sur tapis roulant avec le masque utilisé pour les mesures respiratoires. L'acclimatation consistait à courir sur le tapis roulant à 25cm/s avec une inclinaison de 5° pendant 5 min, 3 jours/sem. Le jour du test triangulaire maximal, après la mesure de la température rectale, les animaux ont été placés sur un tapis roulant (tapis roulant,

Letica, Espagne) pour mesurer la consommation d' O₂ et la production de CO₂. Le quotient respiratoire (QR) a été calculé comme le ratio de VCO₂ / VO₂. Les données VO₂ indiquées sont des moyennes des 60 dernières secondes de chaque palier de vitesse. Le critère de l'épuisement était un temps de 5 secondes passés sur la grille électrique sans courir. VO₂max a été définie comme la valeur VO₂ après laquelle une augmentation de la vitesse n'a plus abouti à une augmentation de VO₂. Un QR supérieur à 1,1 et une concentration de lactate sanguin supérieure à 8 mmol/l ont validé la valeur de VO₂max. La température rectale a été mesurée immédiatement après l'épuisement. Des échantillons de sang au niveau de la queue ont été obtenus immédiatement à la fin de chaque expérience pour mesurer le lactate sanguin à l'aide d'un dispositif pro-LT lactate (Lactate Pro LT-1710, ARKRAY).

1.1.3. Protocole de l'étude des adaptations mitochondriale suite à un stress métabolique versus mécanique par un exercice en descente versus montée

1.1.3.1. Les animaux

L'ensemble de l'expérimentation animale de cette étude a été réalisé selon les recommandations en recherche animale en vigueur et après obtention des autorisations du comité d'éthique en recherche animale de l'Université de Strasbourg. Les expériences ont été réalisées sur des rats Wistar mâles adultes (Depré, France) pesant 400 g environ à l'arrivée.

1.1.3.2. Le test triangulaire maximale

Après deux semaines d'habituation des animaux, nous avons mis en place un premier test triangulaire maximal, afin de déterminer la capacité maximale à l'exercice (voir figure 24). Pour ce faire, nous avons déterminé la VO₂max chez 24 rats sur tapis de course, d'une part en exercice concentrique (+15°; montée UH) et d'autre part en exercice excentrique (-15°; descente DH). Le protocole du test d'effort maximal a été décrit précédemment (Favret et al. 2001, Gonzalez et al., 1994). Après la mesure de la température rectale, les animaux ont été placés sur un tapis roulant avec le masque (comme décrit précédemment) afin de mesurer la consommation d'O₂ et la production de CO₂. Au départ, la vitesse a été fixée à 10cm/s (concentrique, UH) ou à 25cm/s (excentrique, DH) et maintenue pendant 2-3min. La vitesse a ensuite été augmentée de 5 cm/s toutes les 90 secondes pour le groupe UH et de 15 cm/s pour le groupe DH, jusqu'à épuisement des animaux. La température rectale a été mesurée

immédiatement après l'épuisement. Des échantillons de sang à la queue ont été obtenus immédiatement à la fin de l'exercice pour mesurer la lactatémie sanguine à l'aide d'un pro-LT lactate (Lactate Pro LT-1710, ARKRAY ®) et les espèces réactives de l'oxygène par résonance paramagnétique électronique.

1.1.3.3. Le test rectangulaire sous-maximale

Sur la base des résultats du test triangulaire maximal, après une semaine après, nous avons choisi de séparer les rats en trois groupes (voir figure 25) de façon aléatoire:

1) groupe concentrique (UH, +15°) à une vitesse de 25cm/s (80% VO₂max) 2) groupe excentrique (DH, -15°) à une vitesse de 25cm/s (60% VO₂max) 3) groupe excentrique (DH, -15°) à une vitesse de 40cm/s (80% VO₂max). La durée de l'exercice était de 30 minutes.

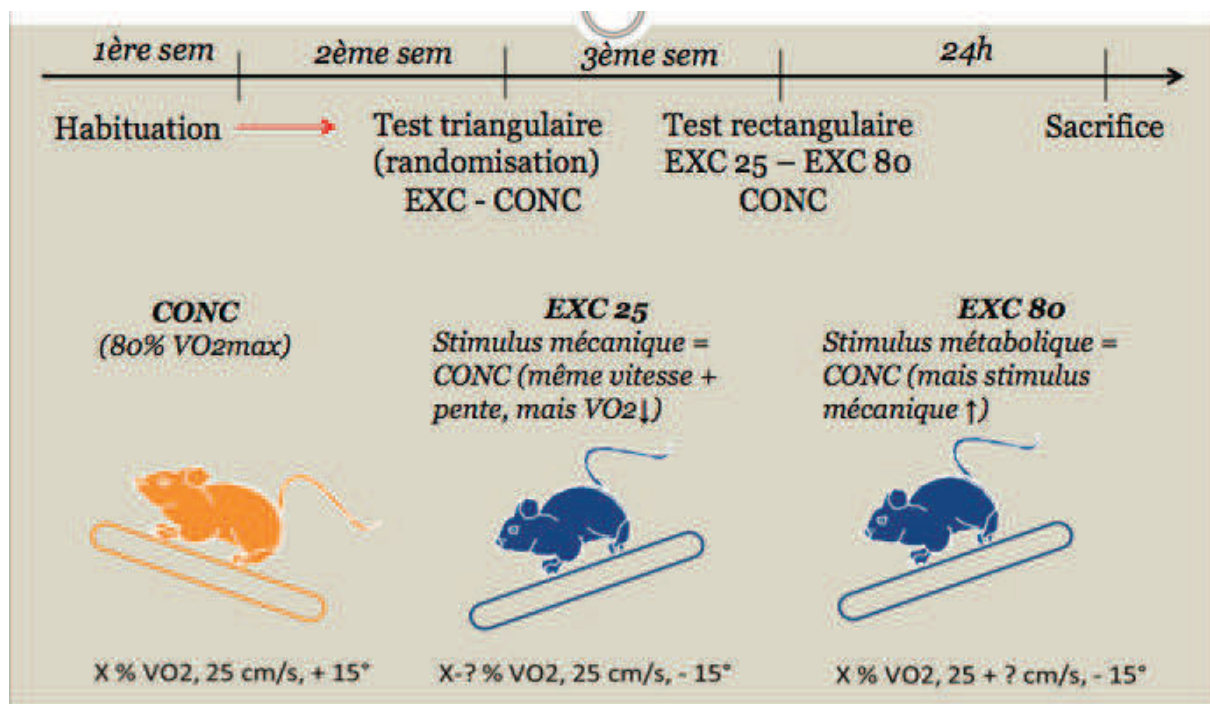


Figure 25. Protocole d'études des adaptations mitochondriales suite à un stress métabolique versus mécanique. Après 2 semaines d'habituation, tous les animaux ont réalisé un test triangulaire maximal en excentrique (EXC) et concentrique (CONC) et ont ensuite été séparés en 3 groupes de façon aléatoire: 1) groupe concentrique (UH, +15°) à une vitesse de 25cm/s (80% VO₂max) 2) groupe excentrique (DH, -15°) à une vitesse de 25cm/s (60% VO₂max) 3) groupe excentrique (DH, -15°) à une vitesse de 40 cm/s (80% VO₂max) pour réaliser un deuxième exercice pendant 30min, une semaine plus tard. 24h après ce dernier exercice, les animaux ont été sacrifiés.

1.1.3.4. Le sacrifice et le prélèvement musculaire

24h après le test sous-maximal, les animaux ont été endormis au pentobarbital (0,1 mL/100g). Des prélèvements musculaires sur le ventricule gauche (phénotype métabolique de type oxydatif), le muscle gastrocnémien (glycolytique), le quadriceps superficiel (glycolytique) et le soléaire (oxydatif) des deux pattes ont été réalisés. Une partie des prélèvements était immédiatement immergée dans des solutions adéquates (selon la nature du prélèvement) à 4°C pour être utilisée pour les études sur la respiration mitochondriale et la production de l'anion superoxyde. Une autre partie des muscles ainsi que le plasma étaient congelés pour différentes études complémentaires. Les animaux ont été ensuite euthanasiés (mis à mort) par prélèvement du cœur.

1.1.4. Protocole de l'étude du découplage mitochondrial (à l'aide du DNP)

1.1.4.1. Description du modèle cellulaires

Culture cellulaire et mesure de l'ATP intracellulaire.

Pour étudier l'effet du DNP in vitro, des myoblastes (L6 Woody, ATCC, Rockville, MD) ont été utilisés. Pour simuler l'exercice, les cellules ont été incubées avec une concentration élevée en l'ADP (100 μ M), activant la respiration mitochondriale. Les cellules ont été cultivées dans des monocouches à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ et à 20% FCS-DMEM. A 70% de confluence, les cellules ont été divisées en quatre groupes: 1) les cellules contrôles (CTL); 2) des cellules incubées avec 50 μ M de DNP (DNP) pendant 24 h ; 3) des cellules incubées avec 100 μ M d'ADP pendant 24 h (ADP); et 4) des cellules co-incubées avec 100 μ M d'ADP et 50 μ M de DNP pendant 24 h (DNP / ADP). La production d'ATP a été mesurée à la fin de la période de 24 h en utilisant un kit ATPlite selon les instructions du fabricant (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT). La luminescence a été détectée en utilisant un compteur Victor3 Wallac Multilabel 1420 (Perkin Elmer).

1.1.4.2. Les animaux

Les expériences ont été réalisées sur des rats Wistar mâles adultes (Depré, France) pesant 400 g. Toutes les expériences ont été effectuées en conformité avec le Guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire publié par le US National Institutes of Health (NIH Publication no. 85-23, révisée en 1996) et ont été approuvés par le comité d'éthique local (CREMEAS).

1.1.4.3. Protocole d'étude

Après 2 semaines d'acclimatation, les rats (12 semaines) ont été répartis au hasard en deux groupes: le groupe de contrôle, recevant de l'eau uniquement (CTL, n = 8) et les rats traités avec l'agent découplant, 2,4-dinitrophénol (groupe DNP, n = 8) ajouté à l'eau potable. Le DNP a été préparé toutes les semaines et mis dans des bouteilles protégées de la lumière. Nous avons choisis une concentration de DNP de $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$, conformément à l'avis de Harper *et al.* (Harper *et al.*, 2001) et suivant nos résultats préliminaires montrant une augmentation de la température à partir de cette dose, mais sur des temps très court (24h à 48h de traitement). Des mesures de la température rectale, du poids, de la consommation d'eau et de la nourriture ont été réalisées quotidiennement.

1.1.4.4. Le test triangulaire maximal

Le test triangulaire maximal a été effectué après 21 jours de traitement (voir figure 26). Après la mesure de la température rectale, les animaux ont été placés sur un tapis roulant pour mesurer la consommation d'O₂ et la production de CO₂. L'inclinaison a été fixé à +5 °, et la vitesse à 30 cm/ s pendant 2min. La vitesse a ensuite été augmenté de 3 cm / s toutes les 90 s jusqu'à l'épuisement de l'animal. Le quotient respiratoire (QR) a été calculé comme le ratio de VCO₂/ VO₂. La température rectale a été mesurée immédiatement après l'épuisement. Des échantillons de sang au niveau de la queue ont été obtenus immédiatement à la fin de l'exercice pour mesurer le lactate sanguin à l'aide d'un dispositif pro-LT lactate (Lactate Pro LT-1710, ARKRAY). Pour évaluer l'économie de course, la consommation d'oxygène a été mesurée à une intensité d'exercice sous-maximale, établie d'après les valeurs maximales obtenues des résultats du test triangulaire. La vitesse d'exercice sous-maximale était de 23,4 m / min (39 cm/ s). A cette vitesse, les animaux étaient dans un état stable pendant les 60 dernières secondes. Un rat dans chaque groupe a été éliminé, car refusant de courir avec le masque.

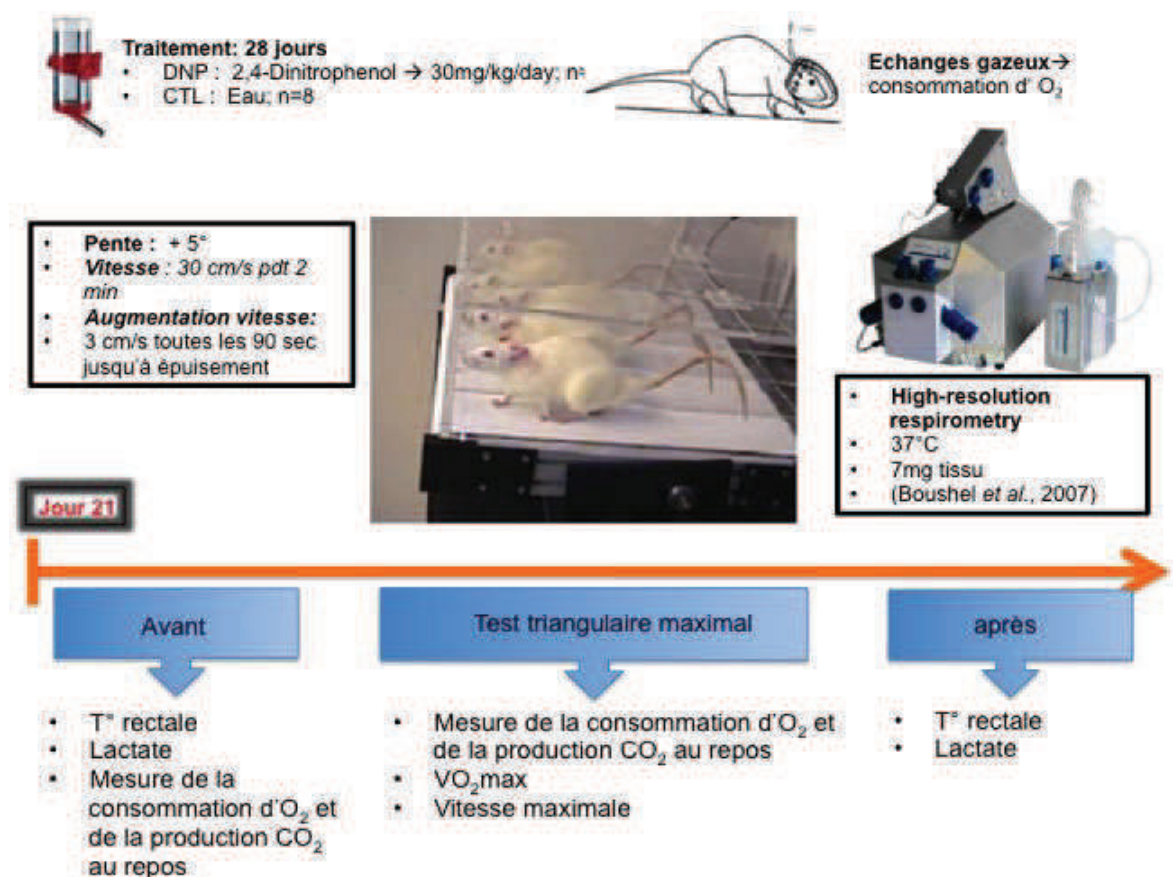


Figure 26. Schéma du protocole d'étude du découplage mitochondrial. Les animaux ont été divisés en deux groupes: 1) le groupe de contrôle, recevant de l'eau uniquement (CTL, n = 8) et 2) le groupe traité avec l'agent découplant, 2,4-dinitrophénol, ajoutée à l'eau potable (DNP, n = 8). Déroulement du test triangulaire maximal après 21 jours de traitement: Mesure de la T° rectale, du lactate, de la consommation d'O₂ et de la production CO₂ avant, pendant et après le test. Analyse de la respiration mitochondriale par respirométrie après le sacrifice.

1.1.4.5. Le sacrifice et prélèvement musculaire

Après 28 jours de traitement, les animaux ont été endormis au pentobarbital (0,1 mL/100g). Le protocole de sacrifice est le même que pour l'étude précédente.

1.1.5. Etude de l'effet protecteur d'un exercice aigu sur la fonction mitochondriale suite à une période d'ischémie reperfusion du muscle squelettique

L'ensemble de l'expérimentation animale de cette étude a été réalisé selon les recommandations en recherche animale en vigueur et après obtention des autorisations du comité d'éthique en recherche animale de l'Université de Strasbourg. Vingt souris ont été séparées en deux groupes. 1) Le groupe contrôle qui a subi une période d'ischémie-reperfusion (IR) sans exercice auparavant (CTL). 2) Le groupe exercice qui a subi une période d'ischémie-reperfusion (IR) avec un exercice de 30min sur tapis roulant, 1h avant (voir figure 26).

1.1.5.1. Le protocole d'exercice

L'exercice était réalisé sur tapis roulant (tapis roulant de contrôle, Letica, Espagne), avec une pente de + 10°, 1 heure avant la période d'I-R. La vitesse du départ a été fixée à 30cm/sec pendant 10min, puis à 35cm/sec à partir de 10min, puis 40cm/sec à partir de 20min jusqu'à 30min. Des légères électrostimulations, au niveau d'une grille fixée au bout du tapis, ont été appliquées pour motiver les animaux à courir. Fin d'épreuve après 30min. Des échantillons sanguins au niveau de la queue ont été obtenus immédiatement à la fin de l'exercice pour mesurer le lactate sanguin à l'aide d'un dispositif pro-LT lactate (Lactate Pro LT-1710, ARKRAY). Après avoir récupéré 30min, les deux groupes ont subi une période de 2h d'ischémie et 2h de reperfusion.

1.1.5.2. Le protocole d'ischémie-reperfusion (I-R)

Les animaux ont été installés dans une cage d'induction hermétique ventilée avec un mélange d'isoflurane à 4% (AERRANE®, BAXTER S.A.S.) et d'oxygène. Après induction anesthésique, les animaux ont été placés sur des plaques chauffantes (MINERVE®, Esternay, France) à 35°C. La ventilation spontanée était maintenue au travers d'un masque délivrant l'oxygène à des concentrations variables d'isoflurane, choisies selon le temps opératoire (2% lors des stimuli douloureux, et 1% lors des temps de latence). Le débit de gaz frais était maintenu entre 1 et 2L/min. L'adéquation du niveau d'anesthésie était testée avant chaque stimulus douloureux par la stimulation plantaire et la recherche d'un mouvement d'évitement.

1.1.6. Technique chirurgicale d'ischémie unilatérale d'un membre inférieur par application d'un garrot à la racine du membre

Pour le protocole d'ischémie-reperfusion, nous avons réalisé une ischémie unilatérale de la patte gauche par mise en place d'un garrot à la racine du membre sans dissection

préalable des plans cutané ou musculo-aponévrotique. Le garrot consistait en une boucle de fil chirurgical et la tension était réalisée en imprimant au fil 20 tours de spires. Les temps d'ischémie et de reperfusion étaient chacune de 2 heures. Dans ce protocole et conformément à nos observations préalables (Pipinos *et al.*, 2007), la patte droite, non soumise au stress d'IR servait de patte contrôle.

L'ischémie était authentifiée par l'apparition d'une cyanose de la ou des patte(s) ainsi que l'élévation de la lactatémie capillaire (Lacate Pro® LT1710; Arkray, KGK, Japan) au-delà de 10mmol/L (Mansour *et al.*, 2012)..

La lactatémie a été mesurée immédiatement avant et après la période d'ischémie et à la fin de la période de reperfusion. Immédiatement à la fin de la période IR, les animaux ont été sacrifiés.

1.1.7. Prélèvements musculaires

Différents muscles des deux pattes postérieures ont été prélevés : les muscles gastrocnémiens (glycolytique), du quadriceps superficiel (glycolytique) et du soléaire (très oxydatif). Une partie des prélèvements était immédiatement immergée dans des solutions adéquates (selon la nature du prélèvement) à 4°C pour être utilisée pour les études sur la respiration mitochondriale et la production d'H₂O₂. Une autre partie était congelée pour des études ultérieures concernant différents types de mesures.

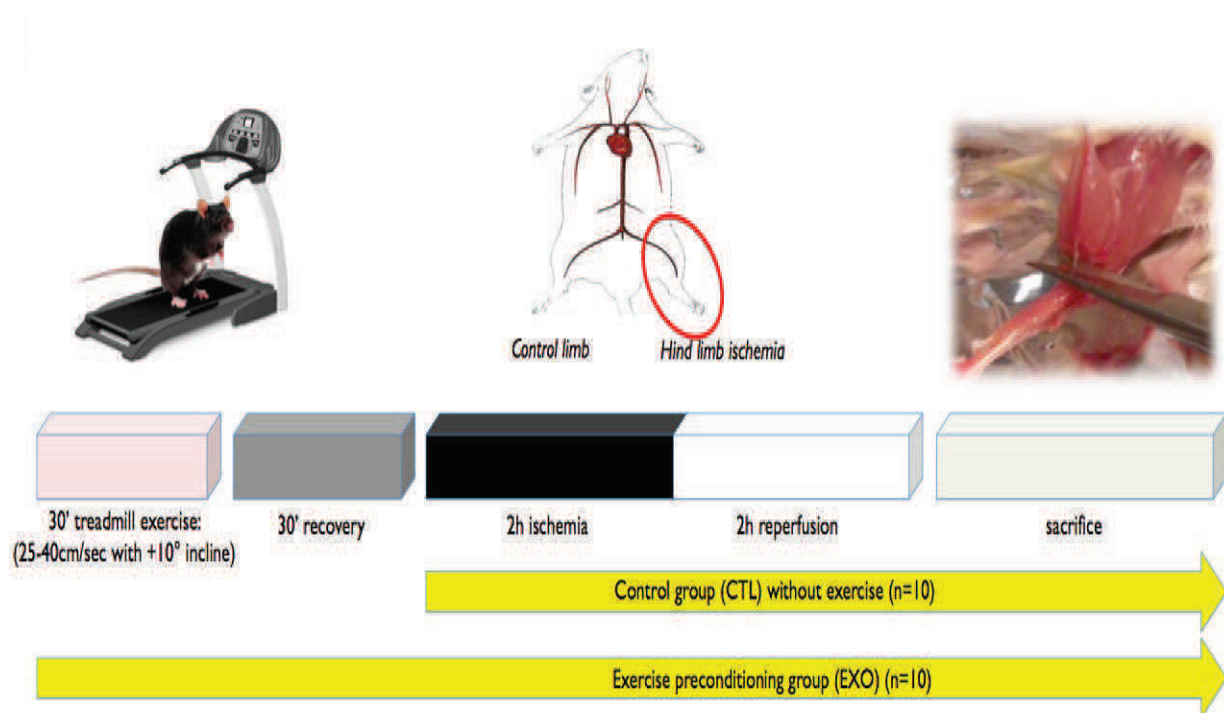


Figure 27. Protocole d'étude de l'effet protecteur d'un exercice aigu avant une période d'ischémie reperfusion sur la fonction mitochondriale.

Les animaux ont été divisés en 2 groupes: 1) Le groupe contrôle qui a subi une période d'ischémie-reperfusion (IR) sans exercice auparavant (CTL; n=10). 2) Le groupe exercice qui a subi une période d'ischémie-reperfusion (IR) avec un exercice sur tapis roulant, 1h avant (EXO; n=10). Le groupe EXO a réalisé une séance de 30min de course sur tapis roulant suivi de 30min de récupération. Les deux groupes ont ensuite subi 2h d'ischémie avec réalisation d'un garrot ischémique au niveau de la racine de la patte postérieure gauche, suivi par 2h de reperfusion. La patte droite servait de contrôle. Après les 4h d'IR, les animaux ont été sacrifiés.

2. PROTOCOLES *IN VITRO* DES TROIS ÉTUDES PRINCIPALES

2.1. Protocole d'étude de la respiration mitochondriale

2.1.1. Solutions

Les solutions de pelage (S) et de respiration (R) utilisées reconstituent le contenu en ions intracellulaires de la fibre musculaire. Les solutions S et R ont une base commune : CaK2EGTA 2,77 mM, K2EGTA 7,23 mM (100 nM de Ca²⁺ libre), MgCl₂ 6,56 mM (1mM de Mg²⁺ libre), imidazole 20 mM, taurine 20 mM, dithiothreitol 0,5 mM, K-sulfonate de méthane 50mM (160mM de force ionique). Le pH des solutions a été ajusté à 7. La solution S

contient également : Na₂ATP 5,7 mM et PCr 15 mM. La solution R contient quant à elle : 5 mM de glutamate, 2 mM de malate, 3 mM de phosphate, à laquelle est ajoutée 2 mg/ml d'albumine (BSA).

2.1.2. Perméabilisation et rinçage des fibres

Après prélèvement musculaire, l'échantillon tissulaire (30-50mg) est immédiatement placé dans la solution S, permettant ainsi de maintenir les fibres musculaires dans des conditions physiologiques. Ces fibres sont ensuite disséquées à l'aide de pinces de précision, sous loupe binoculaire. Cette étape est essentielle afin de permettre l'accès de la saponine aux membranes des fibres musculaires. Puis, intervient l'étape de perméabilisation, les fibres étant placées dans un tube de solution S + saponine (50 µg/ml) sous agitation durant 30 minutes à 4°C (Kuznetsov *et al.*, 2008). Cette étape permet de détruire sélectivement le sarcolemme sans endommager les membranes mitochondriales, moins riches en cholestérol. Les fibres sont ensuite replacées dans un tube de solution S pendant 10 minutes, toujours sous agitation, afin d'éliminer la saponine. Finalement, elles sont placées dans des tubes contenant de la solution R (2x5 minutes), afin d'éliminer complètement la saponine et d'autres métabolites, et toutes traces d'ATP, d'ADP et la PCr, tout en maintenant l'homéostasie cellulaire.

2.1.3. Protocole d'étude de la chaîne de respiration mitochondriale

La respiration des fibres musculaires perméabilisées a été mesurée par respirométrie à haute résolution avec un spiromètre OXYGRAPH-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Autriche) à 37°C, en utilisant 3-7 mg de tissu (poids humide) dans chaque chambre de verre de 2 ml (Boushel *et al.*, 2007). Cette technique assure la détermination de la fonction mitochondriale globale, reflétant à la fois la densité et les propriétés fonctionnelles de la mitochondrie musculaire (Zoll *et al.*, 2002). Pour mesurer la décroissance de la concentration d'oxygène dans les chambres, des électrodes de type Clark sont reliées à un logiciel qui analyse les variations de concentration en oxygène. Ceci permet de calculer la vitesse de consommation d'oxygène pour les différentes chambres qui est un reflet de l'activité de la chaîne de respiration mitochondriale. Différents substrats sont injectés dans la chambre pour activer les différents complexes de la chaîne de respiration mitochondriale :

Initialement, les fibres musculaires sont placées dans la solution R, contenant les substrats qui vont générer du NADH, équivalent réducteur qui donne ces électrons au complexe I : glutamate (5mM) et malate (2mM). L'adjonction de succinate (25mM), substrat qui va générer du FADH₂ grâce à la succinate déshydrogénase, va permettre de stimuler la chaîne respiratoire à partir du complexe II, (activation des complexes II, III et IV (V_{succ})). La consommation d'oxygène ainsi mesurée correspond à l'activité de base de la chaîne de respiration mitochondriale au travers des complexes I, II, III et IV (V_o). On a ensuite injecté de l'ADP (2mM), permettant une stimulation maximale de la chaîne de respiration mitochondriale au travers de ces complexes I, II, III et IV (V_{max}). Le DNP (50μM) a été ajouté pour la deuxième étude. A la fin de la manipulation, les fibres sont récupérées, déshydratées et pesées. Toutes les vitesses sont ainsi exprimées en pmol O₂/sec/mg de fibres en poids sec.

2.2. Protocole de détection de l'anion superoxyde par résonance paramagnétique électronique (RPE)

2.2.1. Solutions

La solution tampon utilisée est du Krebs-Hepes. Il contient : NaCl 99 mM, KCl 4,69 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,03 mM, D(+) Glucose 5,6 mM, Na-Hepes 20 mM. Il a été ajouté à cette solution 25μM de déféroxamine et 5μM de DETC, afin d'éviter une auto-oxydation de la CMH par la solution de Krebs. La CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine HCl) est une sonde moléculaire qui s'oxyde en présence des électrons non appariés des espèces réactives de l'oxygène, sous une forme stable dans le temps. C'est cette CMH oxydée que l'on va ensuite mesurer.

2.2.2. Préparation des fibres

Après prélèvement musculaire, l'échantillon tissulaire (20-30mg) est immédiatement placé dans la solution de Krebs, permettant ainsi de maintenir les fibres musculaires dans des conditions physiologiques. Ces fibres sont ensuite disséquées et coupées en fragments de 1 à 2 mm³, sous loupe binoculaire à 4°C. Les fragments tissulaires sont finalement rincés deux fois dans la solution de Krebs.

2.2.3. Protocole d'étude de la production de l'anion superoxyde

La technique de RPE repose sur un double principe :

1. Il est possible de prolonger la durée de vie des RLO en les associant à une sonde moléculaire qui facilite leur détection
2. Soumis à un champ électromagnétique d'intensité connue et à une radiation micro-onde de fréquence et d'amplitudes connues, un échantillon tissulaire absorbe les radiations de façon proportionnelle à la quantité d'électrons non appariés qu'il contient (Swartz *et al.*, 2007).

Il devient alors possible de quantifier tous les radicaux libres (chacun ayant un spectre d'absorption déterminé) et pas seulement une espèce radicalaire (Vergely *et al.*, 2003).

L'incubation du tissu avec la CMH est réalisée dans un incubateur thermo-régulé et sous atmosphère contrôlée (NOXYGEN®, Allemagne). Les fragments tissulaires sont ainsi placés dans une plaque multi-puits, en présence de Krebs et de CMH (200µM). La plaque est mise à incuber pendant 30 minutes à 37°C, avec comme paramètres atmosphériques : N₂ 97,8%, O₂ 2,8% et +20mmHg de pression pour reproduire la pression partielle d'oxygène présente au niveau tissulaire. La quantification des radicaux libres dérivés de l'oxygène est réalisée sur un aliquot de 40µL de surnageant par résonance paramagnétique électronique thermorégulé à 15°C (Noxygen®, Allemagne).

Ainsi, 40µl de surnageant sont prélevés sur la plaque et analysés par résonance paramagnétique électronique. Les paramètres de réglages permettant de détecter la CMH oxydée sont les suivants : center field $g = 2$, field sweep 60 G, microwave power 60 mW, modulation amplitude 2,48 G, conversion time 10,24 ms, time constant 40,96 ms. La quantité de CMH oxydée, et donc la production de l'anion superoxyde, est mesurée par l'intensité du signal de résonance recueilli. A la fin de la manipulation, les fragments tissulaires sont récupérés, déshydratés et pesés. La production des radicaux libres dérivés de l'oxygène est exprimée en µmol/min/mg de fibres en poids sec.

Pour la production d'anion superoxyde dans le sang, 20 µL de celui-ci ont été mélangés avec 20 µL de sonde CMH (1-hydroxy-3-méthoxy-2, 2, 5, 5-HCl tetramethylpyrrolidine) ainsi que l'héparine (400uM/100U par ml). 40 µL de ce mélange sont ensuite introduits dans un capillaire et placé dans un deuxième tube en verre (Noxygen de

transfert Science, Diagnostics, Allemagne), placé à l'intérieur de la cavité du spectromètre à balayage électronique (Bruker, Allemagne) pour l'acquisition des données. Le principe de détection de la production de RLO est le même que pour le tissu, avec les paramètres suivants: center field $g = 2,011$; field sweep 60 G, microwave power 20 mW, modulation amplitude 2,48 G, conversion time 10,24 ms, time constant 40,96 ms; nombre de balayages: 10. Le signal RPE est proportionnelle au nombre d'électrons non appariés et peut, à son tour, être transformé en micromoles absolues produites (pmol / min).

2.3. Protocole de mesure de la production d'H₂O₂ mitochondriale

2.3.1. Solution

On utilise la solution Z comme tampon. Elle contient : K-MES 110 mM, KCl 35 mM, EGTA 1 mM, K₂HPO₄ 5 mM, MgCl₂ 3 mM, glutamate 5mM, malate 2mM avec 0,5 mg/ml BSA.

2.3.2. Préparation des fibres

L'échantillon tissulaire est disséqué et perméabilisé de manière identique au protocole de respiration mitochondriale. Les fibres sont ensuite placées dans des bains successifs de solution Z (3x9 minutes), sous agitation et à 4°C.

2.3.3. Protocole d'étude de la production d'H₂O₂ mitochondriale

Les analyses se font au travers d'une cuve en quartz placée dans un spectrofluoromètre thermostaté relié à un bain-marie à 37°C (FLUOROMAX-4 spectrophotometer, HORIBA JOBIN YVON®, New Jersey, Etats-Unis). La production d'H₂O₂ est mesurée par la réaction entre l'Amplex Red et l' H₂O₂ (produite par les mitochondries) catalysé par l'HRP (horseradish peroxidase) pour donner de la résorufine et de l'oxygène moléculaire, sous agitation magnétique et température contrôlée à 37°C. La fluorescence est mesurée en continu. La résorufine est excitée à une longueur d'onde de 563 nm et émet à une longueur d'onde de 587 nm. Initialement, les fibres sont placées dans une cuve contenant la solution Z (0.6ml), l'HRP (0,5 U/ml) et l'Amplex Red (5 μM). On injecte alors du glutamate (5mM) et du malate (2mM), substrats du complexe I, permettant d'activer la chaîne de respiration mitochondriale au travers des complexes I, III et IV. Une partie du flux d'électrons créé au

niveau des complexes I et III va réagir avec l'oxygène pour former de l'O₂⁻. Cet O₂⁻ réagit avec la superoxyde dismutase mitochondriale pour donner de l' H₂O₂ :



A la fin de la manipulation, les fibres sont récupérées, déshydratées et pesées. Toutes les vitesses sont ainsi exprimées en pmol H₂O₂/min/mg de fibres en poids sec.

2.4. Evaluation du niveau d'expression des ARNm par q-RT-PCR

2.4.1. Extraction de l'ARN

L'ARN total est extrait avec le TRIzol® selon le protocole du fournisseur Invitrogen. Le TRIzol® est une solution mono-phasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui maintient l'intégrité de l'ARN tout en détruisant les cellules et en dissolvant les autres composés cellulaires. Les échantillons tissulaires (environ 50 mg) sont broyés mécaniquement dans l'azote liquide puis placés immédiatement dans 1 ml de TRIzol®. Afin d'assurer une dissociation des complexes nucléoprotéiques, les échantillons sont ensuite laissés au repos pendant 5 minutes à température ambiante. L'adjonction de chloroforme (0,2 ml par échantillon) est suivie d'une agitation vigoureuse pendant 15 secondes puis d'un contact prolongé à température ambiante (5 à 10 minutes). Les échantillons sont centrifugés à 11000 rpm pendant 15 minutes à 4°C ce qui sépare le contenu des tubes en trois phases distinctes : une phase inférieure organique contenant les protéines, une interphase renfermant l'ADN et une phase supérieure aqueuse transparente contenant exclusivement l'ARN. On récupère uniquement la phase supérieure. L'ARN est ensuite précipité dans la phase aqueuse supérieure par addition de 0,5 volume d'isopropanol. Les tubes sont ensuite agités pendant 30 secondes, laissés à température ambiante pendant dix minutes puis centrifugés à 11000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN est lavé par une solution d'éthanol à 75 % et centrifugé pendant 5 minutes à 7000 rpm à 4°C. Le culot est récupéré et séché à l'air puis remis en suspension dans 10 µl d'eau à 0,1% de diéthyl-pyrocabonate (DEPC), un inhibiteur de nucléase. La pureté des échantillons d'ARN est calculée par le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm (Nanodrop). Un rapport égal ou supérieur à 1,7 indique l'absence de contamination de la préparation d'ARN par l'ADN.

2.4.2. Synthèse de l'ADNc par transcription réverse (RT)

Cette étape est réalisée à l'aide d'un enzyme : le SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). La transcription réverse (RT) est réalisée dans un volume de 20 μ l, en présence de 2 μ g d'ARN dans 10 μ l d'eau DEPC, 5 μ l Buffer 5X, 0.5 μ l de transcriptase réverse, 2 μ l de DTT (0.1M), 1.5 μ l désoxynucléotides triphosphates (10 mM) et 1 μ L d'héxamères p(dN)₆ (200 μ M). Ce mélange réactionnel est incubé à 65°C pendant 5 minutes pour dénaturer l'ARNm. L'ADNc est ensuite synthétisé à 42°C pendant 50 minutes. La transcription réverse est stoppée en chauffant les échantillons à 72°C pendant 15 minutes.

2.4.3. Amplification de l'ADNc par PCR quantitative en temps réel

L'ADNc a été amplifié par le LightCycler (Roche Diagnostic, Meylan, France), en utilisant le kit Invitrogen. La PCR quantitative est également réalisée dans un volume de 8 μ l en présence d'amorces spécifiques sens et antisens du gène d'intérêt (10 μ M) mais cette fois-ci avec 4 μ l tampon de réaction MasterMix (Roche) et 2.5 μ l d'ADNc. Après une première dénaturation à 95°C pendant 10 min, la PCR est réalisée en 45 cycles de dénaturation (10 s à 95°C), d'amorçage (5 s à 60°C) et de polymérisation (12 s à 72°C). Chaque échantillon a été analysé en triple et quantifié selon le protocole du fournisseur (Roche Diagnostics). L'expression relative des différents gènes a été calculée en rapportant les taux d'ARNm à ceux de la β -actin considérée comme le gène domestique.

3. STATISTIQUES

L'ensemble de l'analyse statistique a été effectué à l'aide du logiciel Prism 6® (GraphPad Software, San Diego, USA). Les moyennes des différents groupes ont été comparées par analyse de variance à une ou deux voies avec un post-test de Newman-Keuls. Les résultats de l'analyse de la respiration mitochondriale, de la production d'anion superoxyde et d' H₂O₂ des 2 pattes d'un même animal dans le protocole 3 ont été comparés par le test t apparié de Student. Les données ont été rapportées sous forme de moyenne \pm erreur standard (SEM). Seuls les résultats avec une valeur de p inférieure à 0,05 ont été considérés comme statistiquement significatifs.

RESULTATS

CHAPITRE 1. ETUDE DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE ET DU STRESS OXYDANT APRES UNE COURSE EN DESCENTE ET EN MONTÉE: RÔLE DU STIMULUS MÉCANIQUE ET METABOLIQUE

1.1. Présentation

Un grand nombre d'équipes se sont intéressées aux mécanismes cellulaires à l'origine des atteintes musculaires, cardiaques et squelettiques dans diverses pathologies cardiovasculaires et métaboliques. Traditionnellement, il est conseillé de limiter l'exercice physique intense, réputé pour avoir un effet délétère sur l'évolution des maladies cardiovasculaires et respiratoires (tels que l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) par exemple)) en augmentant la post-charge à un cœur déjà pathologique (Badesch *et al.*, 2004). Toutefois, depuis quelque temps, il a été montré que l'activité physique, en mode concentrique, induisait une amélioration significative de la capacité d'exercice et de la qualité de vie chez les patients présentant une HTAP (Mereles *et al.*, 2006; Handoko *et al.*, 2009b, 2009a).

Cependant, à notre connaissance, la grande majorité des études concernant l'entraînement physique et maladies cardiovasculaires a été réalisée en mode concentrique sur tapis roulant (sans pente), sollicitant grandement les fonctions cardiaque et respiratoire, nécessitant donc une forte consommation en oxygène. Or, il est actuellement connu qu'un entraînement à base d'exercices excentriques permet de majorer les stimuli mécaniques tout en minimisant les stimuli métaboliques (Perrey *et al.*, 2001; Dufour *et al.*, 2004, 2007; Isner-Horobeti *et al.*, 2013). Chez l'homme, l'exercice excentrique a été utilisé avec succès pour améliorer les capacités de force musculaire dans des programmes de réhabilitation menés avec des patients très déconditionnés, tels que les insuffisants cardiaques (coronariens) (Meyer *et al.*, 2003; Steiner *et al.*, 2004), les insuffisants respiratoires (broncho-pneumopathie chronique obstructive) (Rooyackers *et al.*, 2003) ou encore les sujets âgés (80 ans) (LaStayo *et al.*, 2003). Le principal intérêt de ce type d'exercice est de permettre l'atteinte de puissances mécaniques et de forces musculaires importantes tout en étant très peu coûteux au plan métabolique. En effet, le coût en oxygène du pédalage excentrique (EXC) est environ 5 fois plus faible que celui du pédalage concentrique classique (CON) (Perrey *et al.*, 2001). En parallèle de cette spécificité métabolique, le pédalage EXC s'accompagne également d'une

réponse circulatoire spécifique, avec un Q et une FC plus élevés pour une même valeur de VO_2 à l'exercice (Knuttgén *et al.*, 1971; Thomson, 1971). Cependant, les réponses adaptatives induites par l'entraînement sont directement liées à la charge d'entraînement réalisée par l'athlète (Fitts *et al.*, 1975), et à l'importance des stimuli métaboliques et mécaniques qu'elle génère (Fluck & Hoppeler, 2003; Fluck, 2004). Par ailleurs, Close *et al.* (Close *et al.*, 2004) ont démontré chez l'homme, que pour un même taux métabolique, la vitesse n'est que de 10% plus élevé en EXC (-15%) vs CON. Bien que, chez l'homme, la littérature décrivant la différence des taux métabolique entre l'exercice excentrique et concentrique soit abondante (Close *et al.*, 2004; Dufour *et al.*, 2007; Dufour *et al.*, 2004; Perrey *et al.*, 2001), peu d'études ont été réalisées chez le rat, en comparant directement les réponses de VO_2 en EXC vs CONC (Armstrong *et al.*, 1983). Cependant, une telle étude serait nécessaire pour planifier et optimiser un modèle d'entraînement excentrique chez les rats.

Toutefois, il est aujourd'hui clairement admis que l'exercice excentrique induit indéniablement un stress mécanique (Proske & Morgan, 2001; Munehiro *et al.*, 2012), mais également un stress oxydant *via* une production de radicaux libres liée au processus d'inflammation (Lee *et al.*, 2002; Liao, 2012) ou une consommation accrue d'oxygène consommé au cours de l'exercice. Plusieurs études ont établi une relation causale entre les contraintes mécaniques des actions excentriques et les dommages tissulaires ainsi qu'entre la génération de radicaux libres oxygénés (RLO) et les dommages cellulaires. Heureusement, une fois habitué à ce genre d'exercice, on observe une diminution progressive des lésions musculaires. Il semble que même si les deux modalités d'exercice se traduisent par une augmentation de la production de RLO, son évolution dans le temps, son origine et les conséquences peuvent être différentes. A une même intensité métabolique, la production de RLO dans le sang reste inchangée immédiatement après un exercice EXC ou CONC tandis qu'elle augmente spécifiquement 72 heures après un exercice en EXC (Close *et al.*, 2004) chez l'homme. Ces résultats suggèrent que le mécanisme de la production de RLO pourrait impliquer des facteurs inflammatoires ou mécaniques plutôt que le taux métabolique lorsque l'exercice est effectué autour de 65% de consommation maximale d'oxygène (VO_{2max}) (Close *et al.*, 2004).

1.2. L'objet de notre étude

- Mettre au point et valider un nouveau système de mesure de la VO_2 à l'aide d'un masque chez le rat. Comparer la cinétique de consommation d'oxygène lors d'un test triangulaire en excentrique et en concentrique et observer la cinétique de production de RLO immédiatement, 4h, 6h et 24h après la fin de l'exercice.
- L'objectif de l'étude est de montrer dans un premier temps chez l'animal que le travail en excentrique, connu pour sa faible sollicitation du système cardiovasculaire, ne provoque pas d'atteinte du métabolisme musculaire ni de stress oxydant et pourrait donc être un bon moyen d'amélioration de la qualité de vie chez des personnes atteintes de maladies cardiorespiratoires ainsi qu'auprès de personnes âgées à mobilité réduite, compte tenu de son faible coût bioénergétique.
- Analyser la fonction mitochondriale après un exercice en concentrique et excentrique, à une intensité métabolique différente, mais un stimulus mécanique identique.

1.3. Résultats

Les résultats font l'objet d'un article prêt à être re-soumis.

Study of muscular mitochondrial respiration and blood ROS production after acute uphill and downhill exercises: role of mechanical and metabolic stimuli

Study of muscular mitochondrial respiration and blood ROS production after acute uphill and downhill exercises: role of mechanical and metabolic stimuli

Anna-Isabel Schlagowski^{1,3}, Stéphane Dufour^{1,2}, Laurence Rasseneur^{1,2}, Irina Enache^{1,3}, Evelyne Lonsdorfer-Wolf^{1,3}, Stéphane Doutreleau^{1,3}, Marie-Eve Isner-Horobeti^{1,4}, Anne Charloux^{1,3}, Thomas Vogel¹, Anne-Laure Charles¹, Joffrey Zoll^{1,3}, Bernard Geny^{1,3} and Fabrice Favret^{1,2,*}

¹ Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, EA3072 "Mitochondries, Stress Oxydant et Protection Musculaire"

² Université de Strasbourg, Faculté des Sciences du Sport

³ Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Nouvel Hôpital Civil

⁴ Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Institut Universitaire de Réadaptation Clémenceau

Running title : metabolic rate, eccentric exercise, mitochondria

Key words: downhill exercise, reactive oxygen species, mechanical stimulation, mitochondria

*Corresponding author :

Fabrice Favret, PhD

Faculté de Médecine, EA3072: "Mitochondrie, Stress Oxydant et Protection

Musculaire", 4 rue Kirschleger, 67085 Strasbourg, France

Tel:+33 3 68 85 34 38

Email: favret@unistra.fr

Abstract

Purpose

Our study was designed to determine the role of metabolic *versus* mechanical stress on the kinetic of blood reactive oxygen species (ROS) production as well as muscular mitochondrial respiration using uphill and downhill exercises.

Methods

24 rats performed uphill (+15°) and downhill (-15°) incremental tests to determine their O_{2max} in both conditions. Then, animals were separated in three groups exercising 30 minutes at submaximal intensities: 1) uphill at a speed of 25 cm/s (UH, 80% O_{2max}); 2) downhill at 25 cm/s (DH25, ~60% O_{2max}) and downhill at 40 cm/s (DH40, 80% O_{2max}). Blood was removed from the tail to measure systemic ROS. Twenty four hours after the 30-minute exercise, rats are sacrificed and the *vastus intermedius* removed for the mitochondrial respiration assessment as an index of muscular metabolic perturbations.

Results

Our results showed that in both exercise modalities rats reached their O_{2max} . At the end of every submaximal exercises, blood ROS was significantly increased. On the other hand, 4 hours after the exercise, ROS production remained higher only after downhill exercises. The comparison between UH25 and DH25 showed that for a same running speed, the ROS production was higher in DH25 even if the metabolic rate was lower (60% vs 80% in DH25 vs UH25 respectively). Interestingly, maximal mitochondrial respiration was impaired only after downhill at high mechanical stress.

Conclusions

This study suggests that whereas the lactate production followed the metabolic rate, the systemic ROS production as well as the peripheral muscular mitochondrial impairments followed the mechanical stress.

Key words: downhill exercise, reactive oxygen species, mechanical stimulation, mitochondria

Abbreviations

ACR : The acceptor control ratio

DH : downhill

CO₂ : carbon dioxide

EPR : Electron paramagnetic resonance

O₂ : oxygen

ROS : reactive oxygen species

STPD : standard temperature and pressure, dry

UH : uphill

V_{max} : Rate of maximal mitochondria O₂ consumption

O₂: oxygen consumption

O_{2max} : maximal oxygen consumption

Introduction

It has been well described that oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) is much lower in humans exercising eccentrically vs concentrically at the same mechanical power (Dufour et al. 2007, Dufour et al. 2004, Isner-Horobeti et al. 2013, Perrey et al. 2001). Therefore, to reach a given $\dot{V}O_2$ in both exercise modes mechanical power is about four to five times higher in eccentric vs. concentric exercise measured in a cycle ergometer (Dufour et al. 2007, Dufour et al. 2004, Perrey et al. 2001). However, this observation might be exercise type dependent as Close et al. (2004) have reported that, at the same metabolic rate, the speed is only 10 % higher in downhill (-15% decline) vs flat running in humans. Although the literature is abundant in humans describing the difference in metabolic rate between eccentric and concentric exercise (Close et al. 2004, Dufour et al. 2007, Dufour et al. 2004, Perrey et al. 2001), few studies have been done in rats to directly compare the $\dot{V}O_2$ responses to eccentric vs concentric incremental test (Armstrong et al. 1983). However, such knowledge is required to plan and optimize a model of eccentric exercise training in rats.

Downhill exercise is often used as eccentric exercise in rats to focus on the skeletal muscle damage/regeneration processes following the eccentric-induced mechanical stress (Munehiro et al. 2012). Part of this skeletal muscle damage may result from an increase in reactive oxygen species (ROS) secondary to the inflammation process (Liao et al. 2010, Maruhashi et al. 2007). It has been proposed that inflammation may induce ROS production either by stimulation of mitochondrial electron transport chain (Liao et al. 2010) or membrane-bound oxidase or infiltrating phagocytic cells (Best et al. 1999). It is also well known that during exercise, the electron transport through the respiratory chain increases $\dot{V}O_2$ and enhances the free oxygen radical production (Gomes et al. 2012, Halliwell B 2012, Halliwell B, Kyparos et al. 2011, Pringle et al. 2002, Su et al. 2010). It appears that, if both exercise modalities result in an increase in ROS production, its time course, origin and consequences may differ. The blood ROS production, at the same metabolic rate, remain unchanged immediately following either eccentric or concentric exercise while it specifically increases 72 hours after downhill running (Close et al. 2004) in humans. These results suggest that the mechanism(s) of ROS production might involve inflammatory or mechanical factors rather than metabolic rate when exercise is performed around 65% of maximal oxygen uptake ($\dot{V}O_{2max}$) (Close et al. 2004). In humans, it has also been reported that the combination of eccentric and concentric exercise did not result in a larger increase in blood H_2O_2 immediately after exercise, while it did

increase H_2O_2 in blood after 48 hours of recovery (Zembron-Lacny et al. 2010). In rats, Molnar et al. (2006) showed that oxidative stress status remains unchanged immediately following acute eccentric exercise compared to the control group but they did not report any O_2 measurement nor did the study include a concentric control group.

To our knowledge, the time course of blood ROS production following maximal incremental test performed either in concentric or eccentric modalities together with O_2 measurement in rats has never been established. Moreover, the respective role of metabolic rate and/or mechanical power on the observed ROS production time course is unknown. Then, this study is designed to provide new knowledge regarding the intensity at which eccentric exercise could be “safe” for mitochondrial function in order to subsequently plan and optimize eccentric training in rats.

The objective of the study was first to compare the O_2 response during a maximal incremental DH (-15° , -27%) or UH ($+15^\circ$, $+27\%$) exercise test as well as the ensuing time course of post-exercise blood ROS production. The second part of our study was designed to determine the relative contribution of metabolic rate and mechanical power on the responses of blood ROS and mitochondrial function observed after exercise. We therefore challenged the hypothesis that metabolic vs mechanical stress will affect differently blood ROS production and mitochondrial function following eccentric work.

Materials and Methods

Ethical approval

Experiments were performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH publication n°. 85-23, revised 1996). The protocol was approved by the local animal care and use committee (agreement number: n°AL/01/15/08/09).

Animals.

Thirty two Wistar rats weighting 250-300 g (6-8 weeks old, Depré, France) were firstly separated in 4 groups (1 control group and 3 exercise groups) to measure $\dot{V}O_{2max}$ during concentric and eccentric exercise.

Maximal incremental test. The protocol of maximal exercise testing has been described earlier (Favret et al. 2001, Gonzalez et al. 1994). After measuring rectal temperature, the animals were placed on a treadmill (Treadmill Control, Leticia, Spain) with a custom designed facemask for the measurement of $\dot{V}O_2$ consumption and $\dot{V}CO_2$ production. The treadmill was placed either at an angle of + 15° (uphill, UH) for concentric exercise or – 15° (downhill, DH) for eccentric exercise, and the speed was set at 10cm/s (concentric, UH) or at 25cm/s (eccentric, DH) and maintained at this rate for 2-3min. The speed was then increased by 5 cm/s every 90 seconds for UP exercise and by 15 cm/s for DH exercise until $\dot{V}O_{2max}$ was reached. $\dot{V}O_{2max}$ was defined as a $\dot{V}O_2$ value after which an increase in speed did not result in an increase in $\dot{V}O_2$. In the results section (correlation between $\dot{V}O_2$ and speed), we take out the last point when the rats reached a plateau to get linear correlation. Rectal temperature was measured immediately after exhaustion. Blood samples from the tip of the tail were obtained immediately at the end of exercise to measure blood lactate using a lactate pro-LT device (Lactate Pro LT-1710, ARKRAY®) and reactive oxygen species. The results of animals that did not reach the criteria for $\dot{V}O_{2max}$ as described above, were not included in the analysis of the data.

Gas exchange measurements. Gas exchange was measured using a transparent facemask fixed around the neck of the rats at rest and/or during treadmill running. The rate of incoming airflow was maintained constant at 3 l/min. Inflowing and outflowing $\dot{V}O_2$ concentration and outflowing $\dot{V}CO_2$ concentration were monitored continuously with $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$ analyzers ((Ergocard with Exp'Air software version 1.26.35, Medi-Soft, Dinant, Belgium). The

environmental temperature and barometric pressure were continuously recorded, and the obtained gas values were corrected to STPD (standard temperature and pressure, dry). The signals from the gas analyzers were fed into a computer to calculate O_2 and CO_2 (every 5 seconds) with the use of standard gas exchange equations.

Rectangular submaximal exercise protocol. Based on the results of the maximal exercise test we choose to separate the rats in three groups, one exercising at 80% of O_{2max} in UH at a speed of 25 cm/s (UH, 25cm/s, +15° uphill), one exercising at the same mechanical power in eccentric (DH25; 25 cm/s, -15° downhill) and one exercising at the same metabolic rate (DH40, speed 40 cm/s, - 15° downhill) than UP. The duration of exercise was 30 minutes.

Calculations of vertical mechanical work and power. Vertical mechanical work and power were calculated based on the following formula:

Vertical mechanical work (J) = Body Weight (kg) x g (9,81) x Height (m)

Vertical mechanical power (W) = Vertical mechanical work (J) / Time (s)

Lactate analysis in blood. At the end of exercise, a blood sample was removed from the tail immediately following exercise to measure blood lactate concentration using a lactate pro-LT device (Lactate Pro LT-1710, ARKRAY®).

Electron paramagnetic resonance (EPR). At the end of exercise, blood sample was removed from the tail immediately following exercise and after 4 hours, 6 hours and 24 hours of recovery to measure blood ROS. The experimental protocol for ROS detection in blood was adapted from (Mrakic-Sposta et al. 2012). 25µl of blood were collected on the tip of the tail and stored on ice at 4°C. After 30min, 20µl of blood were mixed with 20µl of spin probe CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine HCl)/Heparin (400uM/100U per mL) solution and introduced in a capillary. Stock solution of CMH (5mM, 2.3 mg in 2ml buffer) in Krebs-HEPES buffer containing 25µM deferoxamine methane-sulfonate salt (DF) chelating agent and 5mM sodium diethyldithio-carbamate trihydrate (DETC) at pH 7.4. Immediately after, 40µl of the obtained solution was put in the glass EPR capillary tube (Noxygen Science Transfer, Diagnostics, Germany), that was placed inside the cavity of the e-scan spectrometer (Bruker, Germany) for data acquisition. Sample temperature was firstly stabilized and then kept at 37°C by the Temperature, Gas Controller “Bio III”

unit, interfaced to the spectrometer. Detection of ROS production was conducted using BenchTop EPR spectrometer E-SCAN under the following EPR settings: center field $g = 2.011$; field sweep 60G; microwave power 20mW; modulation amplitude 2G; conversion time 10.24ms; time constant 40.96 ms, number of scans: 10 .The EPR signal is proportional to the unpaired electron numbers and could, in turn, be transformed in absolute produced micromoles ($\mu\text{mol}/\text{min}$).

Mitochondrial respiration in situ. Twenty-four hours after exercise the rats were sacrificed and the *vastus intermedius* which is known to be involved in eccentric and concentric contraction (Armstrong et al. 1983, Armstrong et al. 1983) was removed for further analyses.

Mitochondrial respiratory function was assessed in a water-jacketed oxymeter (Strathkelvin Instruments[®], Glasgow, Scotland) equipped with a Clark type electrode in a room-air saturated oxygen concentration buffer. After recording baseline oxygen content in the chamber, one bundle of 1-2mg wet weight of permeabilized myofibers was placed into the chamber which was sealed shut. The mitochondrial respiration was studied *in situ* in saponin skinned fibres as previously described (Zoll et al. 2003). Mitochondrial respiration in state 2 was assessed in presence of complex I substrates glutamate-malate (10:5 mM, V_{GM}). Mitochondrial respiration in state 3 was assessed using different substrates and the following additions were sequentially made: ADP (2mM, V_{GM-ADP}), the complex I blocker amytal (2mM), the complex II substrate succinate (25mM, $V_{succ-ADP}$), the complex IV substrate N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (TMPD- ascorbate (0.5:2mM, $V_{TMPD-ADP}$).The acceptor control ratio (ACR) was determined as V_{max}/V_0 and represents the degree of coupling between oxidation and phosphorylation. At the end of each assay, muscle fibres were harvested and dried for 15 min at 150°C. Rates of O_2 consumption were expressed in mg dry weight per minute ($\mu\text{moles } O_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry weight}$). All respiratory experiments were performed in duplicates for each animal.

Statistical analysis. Data are expressed as means \pm SEM. The normality of distribution was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. The effects of exercise (concentric or eccentric) were tested using a one-way analysis of variance for independent groups (ANOVA). Newman-Keuls procedure was used for post- hoc test. The effects of time and exercise modality on blood ROS production was assessed using a two-way ANOVA. All statistical analyses were done using the GraphPad Prism 5 (GraphPad Software inc., San Diego, CA, USA). A P value <0.05 was considered as a significant difference.

Results

Maximal incremental test

$\dot{V}O_{2\max}$ is not different in DH vs UH exercise, but the slope of the $\dot{V}O_2$ /speed relationship is different between exercise modalities (Figure 1). At the corresponding higher speed (35 cm/s, +15°) in eccentric vs concentric exercise, the $\dot{V}O_2$ is ~30% lower in eccentric. It should be noted that in both exercise tests animals reach a $\dot{V}O_{2\max}$ plateau but in figure 1 we just present the last point before the plateau to obtain a linear regression in both exercise modalities.

At exhaustion, blood lactate concentration and blood ROS are similar in both exercise modes (Figure 2A and 2B). Blood ROS remain higher than basal value, at 4 and 6 hours following both exercise modalities. After 24 hours recovery, blood ROS returned to basal value 24 hours after concentric exercise whereas it increased over the basal and 6 hours post-exercise values after eccentric exercise.

Rectangular exercise

This submaximal single-bout exercise is designed to test the respective role of metabolic and/or mechanical stimulus on blood ROS production and their consequences on mitochondrial function (*vastus intermedius*). Then, three groups of rats perform 30 minutes running either in UH (+ 15° at 80 % of their own $\dot{V}O_{2\max}$) at a speed of ~25cm/s or in DH conditions (-15°) at the same speed (~60% of $\dot{V}O_{2\max}$, 25 cm/s) or at 80% of $\dot{V}O_{2\max}$ (speed ~40cm/s) (Table 1). The vertical mechanical work and power are the same in UH and DH25 whereas higher values are observed in DH40 (Table 1).

Figure 3A shows that lactate concentration is 42% lower at the same speed in DH25 vs UH ($p < 0.05$) whereas no difference occurs between exercise mode when compared at similar metabolic rate (DH40 vs UH). Blood ROS production increases immediately after exercise in all groups (Fig. 3B) and remains elevated after 4 hours only in DH40 vs UH while it does not reach significance in UH25. ROS returns to basal value after 24 hours in all groups.

Muscle mitochondrial respiration

Skeletal muscle mitochondrial respiration is assessed in the *vastus intermedius*, involving in both concentric and eccentric contractions, 24 hours after rectangular exercise. V_{\max} decreases in the *vastus intermedius* only in DH40 groups (Fig. 4A) while it tends to decrease

in DH25. V_{tmpd} , which reflect the complex IV activity, diminishes in DH40 only (Fig. 4B). Moreover the acceptor control ratio (V_{max}/V_o) is lower in DH40 (Fig. 4C).

Discussion

Our results show for the first time in rats that it is possible to reach $\dot{V}O_{2max}$ with UH incremental test and that during a running speed of 35cm/s, $\dot{V}O_2$ is ~30 % lower in DH compared to UP exercise. Further, blood ROS increases immediately following both maximal incremental tests and remains elevated 24 hours after UH exercise. Surprisingly, blood ROS is not differently affected by mechanical vs metabolic stimulus after exercise. Finally, only high mechanical power eccentric exercise impairs mitochondrial respiratory chain complex activities and coupling.

Uphill incremental test allows reaching $\dot{V}O_{2max}$

Our measurement of $\dot{V}O_{2max}$ using a facemask is not usual as compared to the literature which use often an enclosed treadmill adapted for determination of $\dot{V}O_2$ uptake ($\dot{V}O_2$) and $\dot{V}CO_2$ production ($\dot{V}CO_2$) (Favret et al. 2003, Favret et al 2001, Gonzalez et al. 1994, Jorge et al. 2011, Wisloff et al. 2001). Nevertheless we are able to reach $\dot{V}O_{2max}$ with the mask although our value is higher than those reported in literature (Favret et al. 2003, Favret et al 2001, Gonzalez et al. 1994, Jorge et al. 2011, Wisloff et al. 2001). It should be noted that since the airflow is low, the change in $\dot{V}O_2$ is recorded with precision and then the $\dot{V}O_2$ value rather to be correct.

For the first time in rats, an eccentric incremental test is used to reach $\dot{V}O_{2max}$. Although numerous studies have been done using eccentric exercise in rats, the experimental protocols are rarely described in terms of metabolic rate/mechanical power. Since the types of contraction in a treadmill depend on the grade, we chose to use 15° incline and 15° decline which have been shown to produce mainly concentric and eccentric contraction respectively (Armstrong et al. 1983, Powers et al. 2008). Our study allows determining at which $\dot{V}O_2$ corresponds the mechanical power used in eccentric protocol in rats although specific muscle activities are complex with the same muscle producing positive and mechanical work during its shortening phase and having negative work performed on it during the lengthening phase.

Although the animals reach $\dot{V}O_{2max}$ in both exercise modes, the difference in running speed between concentric and eccentric exercise could be underestimated since it has been shown that the most economical grade in terms of $\dot{V}O_2$ is between - 6 and - 15 % (Johnson et al. 2002), but part of our objective was to induce mainly eccentric contraction which justify using an important decline. It should also be noted that in human the literature reports that in human

the difference in eccentric vs concentric exercise is more marked using a cycle ergometer (Dufour et al. 2007, Dufour et al. 2004).

Effect of maximal exercise on blood ROS and lactate

This model of exercise (i.e. treadmill running) allow us to use the O_2 /running speed relationship in eccentric and concentric mode to determine the relative contribution of the mechanical stimulus in the changes occurring in skeletal muscle, particularly in ROS. Our data show that immediately after maximal exercise, both concentric and eccentric exercise induced a marked increase in blood ROS production. These data have been already discussed following concentric exercise which is characterized by an elevation or activation of the electron transport through the respiratory chain increasing the free oxygen radical production (Gomes et al. 2012, Halliwell B 2012, Halliwell B 1994, Su et al. 2010). Since rats running downhill reach the same $\text{O}_{2\text{max}}$, it is reasonable to think that the increase in ROS immediately after exercise is also due to the activation of the respiratory chain. Several studies report an increase in blood ROS production 48 to 72 hours after eccentric exercise, which was not maximal (Close et al. 2004), despite no change after 24 hours. We observe a rise in blood ROS production 24 hours following maximal DH incremental exercise. This result could suggest an inflammatory process presumably induced by the higher mechanical power (i.e. 70 cm/s vs 35 cm/s). Indeed Close *et al.* (2004) describe that ROS production implies inflammatory or mechanical factors rather than metabolic rate after eccentric exercise. Then following maximal DH exercise it seems reasonable to think that two processes take place to induce an increase in blood ROS production, one due to the activation of the respiratory chain (i.e. muscle metabolic power/stimulation) and one, delayed, due to inflammation (i.e. somehow linked to the consequences of muscle mechanical power/stimulation) (Davis et al. 2007). Inflammatory processes may induce ROS generation through stimulation of mitochondrial electron transport chain (Liao et al. 2010), membrane-bound oxidase and/or infiltrating phagocytic cells (Best et al. 1999).

The lactate concentration is similar between both modalities of exercise which is not surprising since rats reach in both cases similar $\text{O}_{2\text{max}}$.

Effect of rectangular exercise on ROS and lactate

Blood ROS production increases similarly in DH25, DH40 and UP immediately after exercise independently of the metabolic rate and remains elevated 4 hours after exercise only in DH40.

Blood ROS returned to basal value in all exercise groups 24 hours after exercise. The literature described a rise in ROS 48 to 72 hours following eccentric exercise (Close et al. 2004). It has been also observed previously (and in our incremental protocol as well) that the mechanical power is an important factor of the post exercise ROS production (Close et al. 2004). We did not evidence a specific rise in blood ROS production 24 hours after UH exercise performed either at the same mechanical power or at the same metabolic rate (i.e. higher mechanical power) than concentric exercise. However, it cannot be excluded that blood ROS will increase later as previously described in the literature. Liaio *et al.* (2010) have found an increase in H₂O₂ in the *vastus lateralis* muscle in rats 24 hours after eccentric exercise. Kyparos *et al.* (2011), using a similar protocol (-16° decline and 25 cm/s), observe an inflammation process 48 hours post exercise. Aio *et al.* (2004) describe that prolonged exercise into a treadmill leads also to an increase in ROS production in the gastrocnemius muscle 24 hours after exercise. From our results it seems that 30 min of uphill exercise are not able to enhance blood ROS production.

Blood lactate is increased following exercise in UH and DH40 groups but remained unchanged in DH25. These results confirm the data of Dufour *et al.* (2007) in humans showing that at the same mechanical power the lactate is lower following eccentric exercise due to a lower metabolic rate.

Mitochondrial function in the vastus intermedius

Mitochondrial function is assessed by mitochondrial respiration in the *vastus intermedius* muscle. No change is observed 24 hours after a single bout exercise in UH group as previously shown by Daussin *et al.* (2012) although the intensity as well as the duration of exercise are two keys factors of the change in mitochondrial respiration following acute exercise. Recently, Rattray *et al.* (2011) report, 48 hours after eccentric exercise, a decrease in the respiratory control rate in rats in the *vastus* group skeletal muscle. These data on mitochondrial function are controversial since some, but not all studies have found a fall in respiration rate after acute eccentric exercise (Molnar et al. 2006, Walsh B et al. 2001). Our data on the *vastus intermedius* 24 hours after submaximal rectangular exercise are in line with the data of Rattray *et al.* (2011). VADP tends to decrease in DH25 while it is significantly lower in DH40 demonstrating that the mechanical factor may play an important role on the mitochondrial function and suggest that eccentric exercise may induce mitochondrial dysfunction after 24h of recovery when the mechanical power is high. Moreover we show for

the first time that higher is the eccentric mechanical power greater is the depression of the respiration of several complex of the respiratory chain. Additionally, we observe a decrease in mitochondrial coupling after DH40. Several causes are described in the literature possibly explaining mitochondrial dysfunction such as a rise in ROS, an inflammation and/or an elevated intracellular calcium level (Ratnayake et al. 2011). Our data did not support a role of ROS since blood ROS is similar in both UH and DH exercising rats but point to a likely role of mechanical factors.

Taken together, our data show that downhill exercise can lead to mitochondrial dysfunction depending on the level of muscle mechanical stimulation. However, the observed mitochondrial dysfunction after high level muscle mechanical stimulation do not seem to be linked to exacerbated blood ROS production. Further studies are necessary to establish whether these deleterious effects of DH exercise will persist following chronic DH exercise.

In summary our study shows that rats are able to reach $\dot{V}O_{2max}$ during DH incremental exercise on treadmill and that for a given running speed of 35 cm/s, $\dot{V}O_2$ is 30% lower during downhill running. Maximal incremental DH exercise leads to a rise in blood ROS production immediately after exhaustion and persisting 24 hours post exercise recovery which could be due to an increase in respiratory chain and inflammatory mechanisms, respectively. Blood ROS production increases similarly following submaximal rectangular exercise in UH and DH groups. A mitochondrial dysfunction, as assessed by the alteration of complex I, III and IV and ACR was observed after high but not low intensity eccentric exercise and presumably occurred as the consequences of high levels of muscle mechanical stimulation. Therefore, our data suggest that eccentric exercise needs to be finely adapted to the targeted population in such a way to minimize the deleterious effect of too high muscle mechanical stimulation. At this condition, eccentric exercise may represent an interesting alternative to prevent skeletal muscle deconditioning and to improve exercise capacity in patient with severe $\dot{V}O_2$ transport/utilization limitations. Indeed, some benefits, such as metabolic and anti-inflammatory effects, have been described in human following chronic eccentric exercise (Drexler et al. 2008, Liao et al. 2010, Zoll et al. 2003).

Acknowledgement

We are grateful to Isabelle Bentz, Fabienne Goupilleau and Jean-Pierre Speich for their technical assistance.

Grants

Conflicts of interest

None

References

1. Aoi, W., Naito, Y., Takanami, Y., Kawai, Y., Sakuma, K., Ichikawa, H., Yoshida, N., and Yoshikawa, T. 2004. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radic. Biol. Med.* **37**: 480-487.
2. Armstrong, R.B., Laughlin, M.H., Rome, L., and Taylor, C.R. 1983. Metabolism of rats running up and down an incline. *J. Appl. Physiol.* **55**: 518-521.
3. Armstrong, R.B., Ogilvie, R.W., and Schwane, J.A. 1983. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **54**: 80-93.
4. Best, T.M., Fiebig, R., Corr, D.T., Brickson, S., and Ji, L. 1999. Free radical activity, antioxidant enzyme, and glutathione changes with muscle stretch injury in rabbits. *J. Appl. Physiol.* **87**: 74-82.
5. Close, G.L., Ashton, T., Cable, T., Doran, D., and MacLaren, D.P. 2004. Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species. *Eur. J. Appl. Physiol.* **91** : 615-621.
6. Daussin, F.N., Rasseneur, L., Bouitbir, J., Charles, A.L., Dufour, S.P., Geny, B., Burelle, Y., and Richard, R. 2012. Different timing of changes in mitochondrial functions following endurance training. *Med. Sci. Sports Exerc.* **44**: 217-224.
7. Davis, J.M., Murphy, E.A., Carmichael, M.D., Zielinski, M.R., Groschwitz, C.M., Brown, A.S., Gangemi, J.D., Ghaffar, A., and Mayer, E.P. 2007. Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**: R2168-R2173.
8. Drexel, H., Saely, C.H., Langer, P., Loruenser, G., Marte, T., Risch, L., Hoefle, G., and Aczel, S. 2008. Metabolic and anti-inflammatory benefits of eccentric endurance exercise - a pilot study. *Eur. J. Clin. Invest.* **38** : 218-226.
9. Dufour, S.P., Doutreleau, S., Lonsdorfer-Wolf, E., Lampert, E., Hirth, C., Piquard, F., Lonsdorfer, J., Geny, B., Mettauer, B., and Richard, R. 2007. Deciphering the metabolic and mechanical contributions to the exercise-induced circulatory response: insights from eccentric cycling. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**: R1641-1648.
10. Dufour, S.P., Lampert, E., Doutreleau, S., Lonsdorfer-Wolf, E., Billat, V.L., Piquard, F., and Richard, R. 2004. Eccentric cycle exercise: training application of specific circulatory adjustments. *Med. Sci. Sports Exerc.* **36**: 1900-1906.

11. Favret, F., Henderson, K.K., Richalet, J-P., and Gonzalez, N.C. 2003. Effects of exercise training on acclimatization to hypoxia: systemic O₂ transport during maximal exercise. *J. Appl. Physiol.* **95**: 1531-1541.
12. Favret, F., Richalet, J-P., Henderson, K.K., Germack, R., and Gonzalez, N.C. 2001. Myocardial adrenergic and cholinergic receptor function in hypoxia: correlation with O₂ transport in exercise. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280**: R730-738.
13. Gomes, E.C., Silva, A.N., and de Oliveira, M.R. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid. Med. Cell. Longev.* Epub 2012 Jun 3.
14. Gonzalez, N.C., Erwig, L.P., Painter, C.F. 3rd, Clancy, R.L., and Wagner, P.D. (1994). Effect of hematocrit on systemic O₂ transport in hypoxic and normoxic exercise in rats. *J. Appl. Physiol.* **77**: 1341-1348.
15. Halliwell, B. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr. Rev.* **70**: 257-265.
16. Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* **52** : 253-265.
17. Isner-Horobeti, M-E., Dufour, S.P., Vautravers, P., Geny, B., Coudeyre, E., and Richard, R. 2013. Eccentric exercise training: modalities, applications and perspectives. *Sports Med.* **43**: 483-512.
18. Johnson, A.T., Benjamin, M.B., and Silverman, N. 2002. Oxygen consumption, heat production, and muscular efficiency during uphill and downhill walking. *Appl. Ergon.* **33**: 485-491.
19. Jorge, L., Rodrigues, B., Rosa, K.T., Malfitano, C., Loureiro, T.C., Medeiros, A., Curi, R., Brum, P.C., Lacchini, S., Montano, N., De Angelis, K., and Irigoyen, M.C. 2011. Cardiac and peripheral adjustments induced by early exercise training intervention were associated with autonomic improvement in infarcted rats: role in functional capacity and mortality. *Eur. Heart J.* **32**: 904–912.
20. Kanter, M.M. 1994. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Int. J. Sport Nutr.* **4**: 205-220.
21. Kyparos, A., Sotiriadou, S., Mougios, V., Cheva, A., Barbanis, S., Karkavelas, G., Arsos, G., Albani, M., and Matziari, C. 2011. Effect of 5-day vitamin E

- supplementation on muscle injury after downhill running in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* **111**: 2557-2569.
22. Liao, P., Zhou, J., Ji, L.L., and Zhang, Y. 2010. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor-alpha. *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**: R599-R607.
23. Marcus, R.L., Smith, S., Morrell, G., Addison, O., Dibble, L.E., Wahoff-Stice, D., and Lastayo, P.C. 2008. Comparison of combined aerobic and high-force eccentric resistance exercise with aerobic exercise only for people with type 2 diabetes mellitus. *Phys. Ther.* **88**: 1345-1354.
24. Maruhashi, Y., Kitaoka, K., Yoshiki, Y., Nakamura, R., Okano, A., Nakamura, K., Tsuyama, T., Shima, Y., and Tomita, K. 2007. ROS scavenging activity and muscle damage prevention in eccentric exercise in rats. *J. Physiol. Sci.* **57**: 211-216.
25. Molnar, A.M., Servais, S., Guichardant, M., Lagarde, M., Macedo, D.V., Pereira-Da-Silva, L., Sibille, B., and Favier, R. 2006. Mitochondrial H₂O₂ production is reduced with acute and chronic eccentric exercise in rat skeletal muscle. *Antioxid. Redox. Signal* **8**: 548-558.
26. Mrakic-Sposta, S., Gussoni, M., Montorsi, M., Porcelli, S., and Vezzoli, A. Assessment of a standardized ROS production profile in humans by electron paramagnetic resonance. *Oxid Med Cell Longev.* Epub 2012 Jul 26.
27. Munehiro, T., Kitaoka, K., Ueda, Y., Maruhashi, Y., and Tsuchiya, H. 2012. Establishment of an animal model for delayed-onset muscle soreness after high-intensity eccentric exercise and its application for investigating the efficacy of low-load eccentric training. *Orthop. Sci.* **17**: 244-252.
28. Perrey, S., Betik, A., Candau, R., Rouillon, J.D., and Hughson, R.L. 2001. Comparison of oxygen uptake kinetics during concentric and eccentric cycle exercise. *J. Appl. Physiol.* **91**: 2135-2142.
29. Powers, S.K., and Jackson, M.J. 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* **88**: 1243-1276.
30. Pringle, J.S., Carter, H, Doust, J.H., and Jones, A.M. 2002. Oxygen uptake kinetics during horizontal and uphill treadmill running in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* **88**, 163-169.

31. Rattray, B., Caillaud, C., Ruell, P.A., and Thompson, M.W. 2011. Heat exposure does not alter eccentric exercise-induced increases in mitochondrial calcium and respiratory dysfunction. *Eur. J. Appl. Physiol.* **111**: 2813-2821.
32. Su, Q.S., Zhang, J.G., Dong, R., Hua, B., and Sun, J.Z. 2010. Comparison of changes in markers of muscle damage induced by eccentric exercise and ischemia/reperfusion. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **20**: 748-756.
33. Walsh, B., Tonkonogi, M., Malm, C., Ekblom, B., and Sahlin, K. 2001. Effect of eccentric exercise on muscle oxidative metabolism in humans. *Med. Sci. Sports Exerc.* **33**: 436-441.
34. Wisløff, U., Helgerud, J., Kemi, O.J., and Ellingsen, O. 2001. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO₂ max) and cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**: H1301-H1310.
35. Zembron-Lacny, A., Naczka, M., Gajewski, M., Ostapiuk-Karolczuk, J., Dziewiecka, H., Kasperska, A., and Szyszka, K. 2010. Changes of muscle-derived cytokines in relation to thiol redox status and reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol. Res.* **59**: 945-951.
36. Zoll, J., Steiner, R., Meyer, K., Vogt, M., Hoppeler, H., and Flück, M. 2006. Gene expression in skeletal muscle of coronary artery disease patients after concentric and eccentric endurance training. *Eur. J. Appl. Physiol.* **96**: 413-422.
37. Zoll, J., N'Guessan, B., Ribera, F., Lampert, E., Fortin, D., Veksler, V., Bigard, X., Geny, B., Lonsdorfer, J., Ventura-Clapier, R., and Mettauer, B. 2003. Preserved response of mitochondrial function to short-term endurance training in skeletal muscle of heart transplant recipients. *J. Am. Coll. Cardiol.* **42**: 126-132.

Figures legends

Figure 1. Oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) during incremental test in uphill (UH) or downhill (DH) exercise modality.

Figure 2. Changes in blood lactate (A) and blood reactive oxygen species (ROS) (B) pre and post UH or DH maximal oxygen uptake. Figure 1A *, $p < 0.05$ Post vs Pre. Figure 1B *, $p < 0.05$ vs DH at time 0; &, $p < 0.05$ vs UH at time 0.

Figure 3. Effect of mechanical vs metabolic stimulation on blood lactate and Δ blood ROS after submaximal rectangular exercise. Figure 1A *, $p < 0.05$ Post vs Pre. Figure 1B *, $p < 0.05$ DH40 vs UP at the same time.

Figure 4. Effect of mechanical vs metabolic stimulation on mitochondrial respiratory chain complex. *, $p < 0.05$ DH40 vs CTL, UP and DH25. # $p < 0.05$ DH40 vs CTL and UP.

Table 1: Body weight, oxygen uptake ($\dot{V}O_2$) and vertical mechanical work and power during submaximal rectangular exercise and rectal temperature (Tr) after exercise. * $p < 0.05$ UH, DH25 and DH40 vs CTL; † $p < 0.05$ DH25 vs UH and DH40 ; # $p < 0.05$ DH40 vs UP and DH25.

	CTL	UH	DH25	DH40
Body Weight (g)	501 ± 7	421±8*	423±7*	402±14*
$\dot{V}O_2$(mL/min/kg)	-	77±1	59±2†	75±3
$\dot{V}O_{2max}$(%)	-	81±2	62±2†	76±3
Speed (cm/s)	-	24.3±0.3	25	40.5±2.3#
Tr (°C)	-	39.5±0.4	38.1±0.4†	39.2±0.3
Vertical mechanical work (J)	-	463±9	-483±8	-738±16#
Vertical mechanical power (W)	-	0.257±0.005	-0.268±0.004	-0.410±0.010#

Figure 1

Incremental test

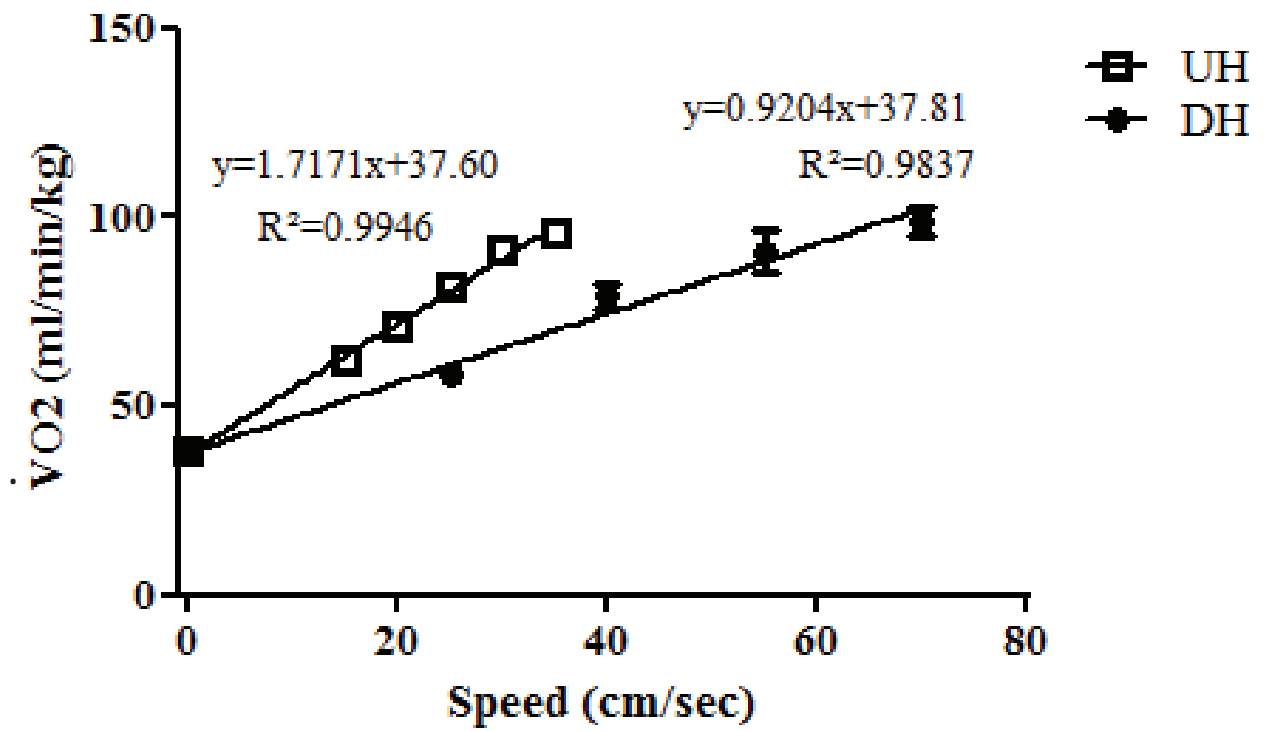


Figure 2

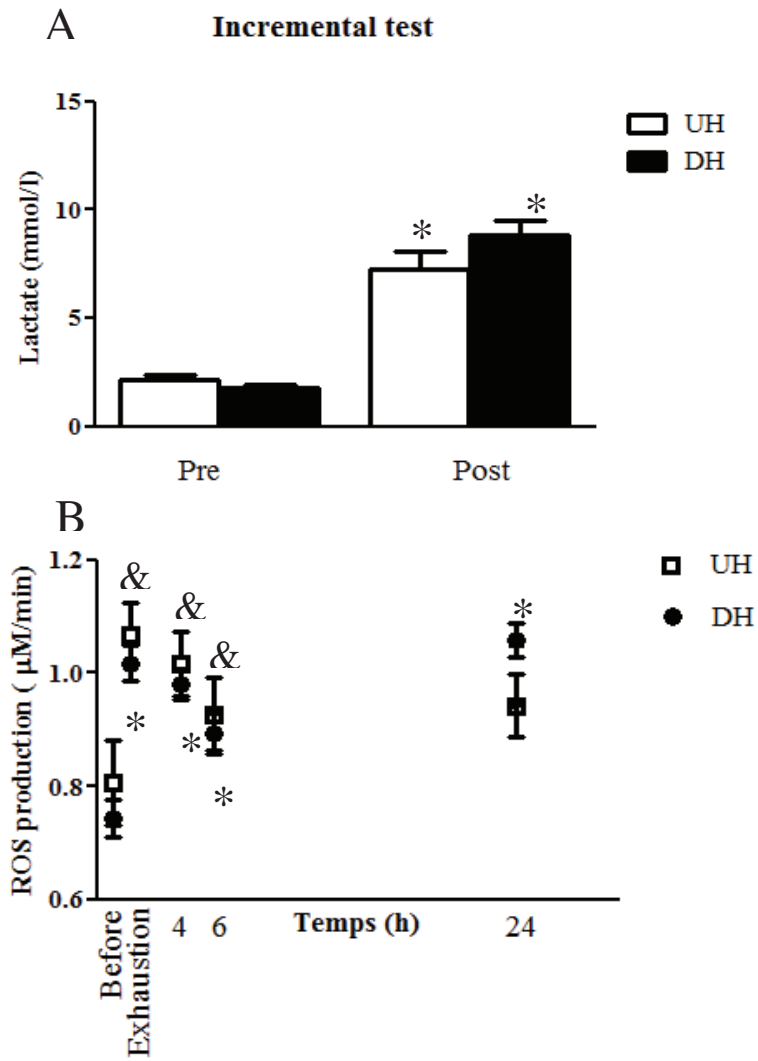


Figure 3

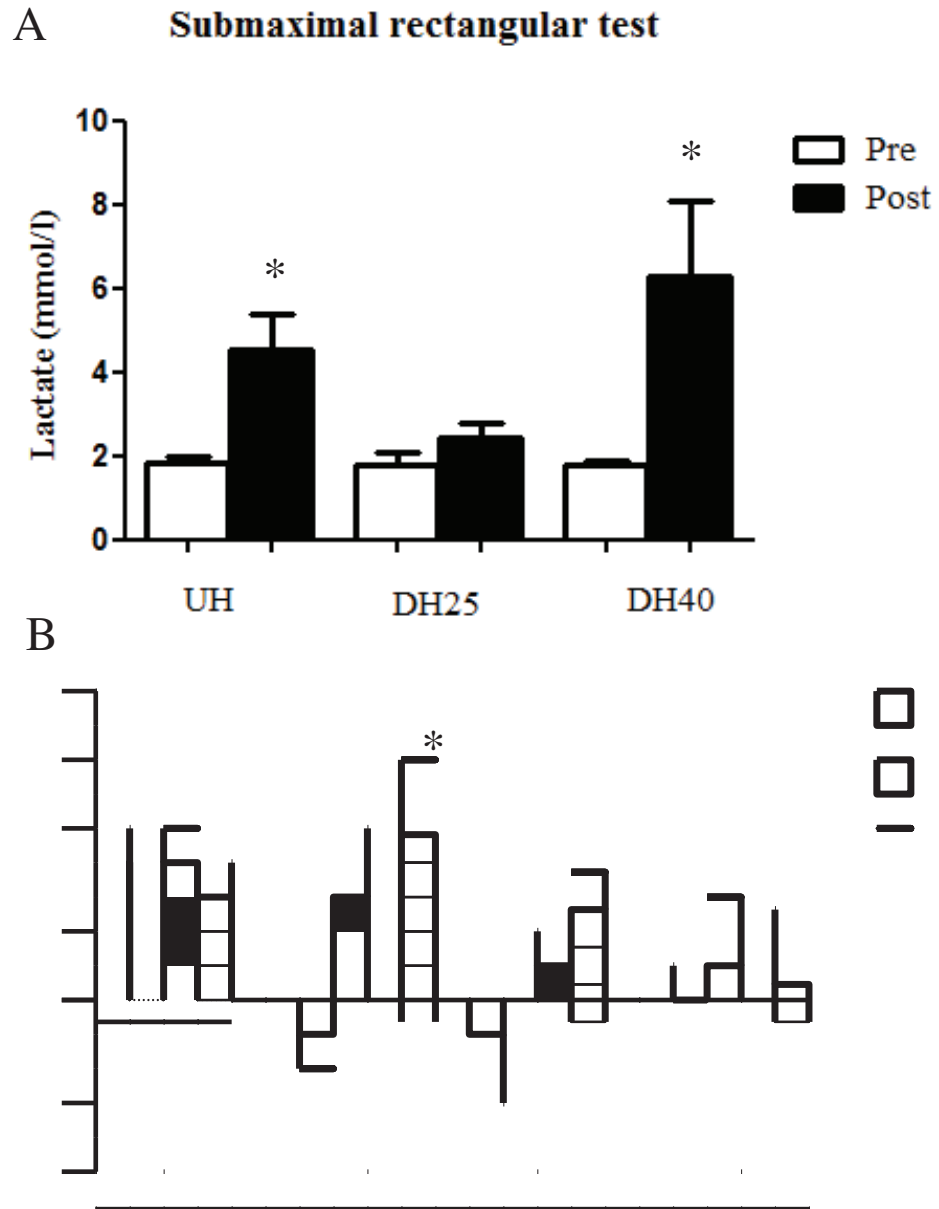
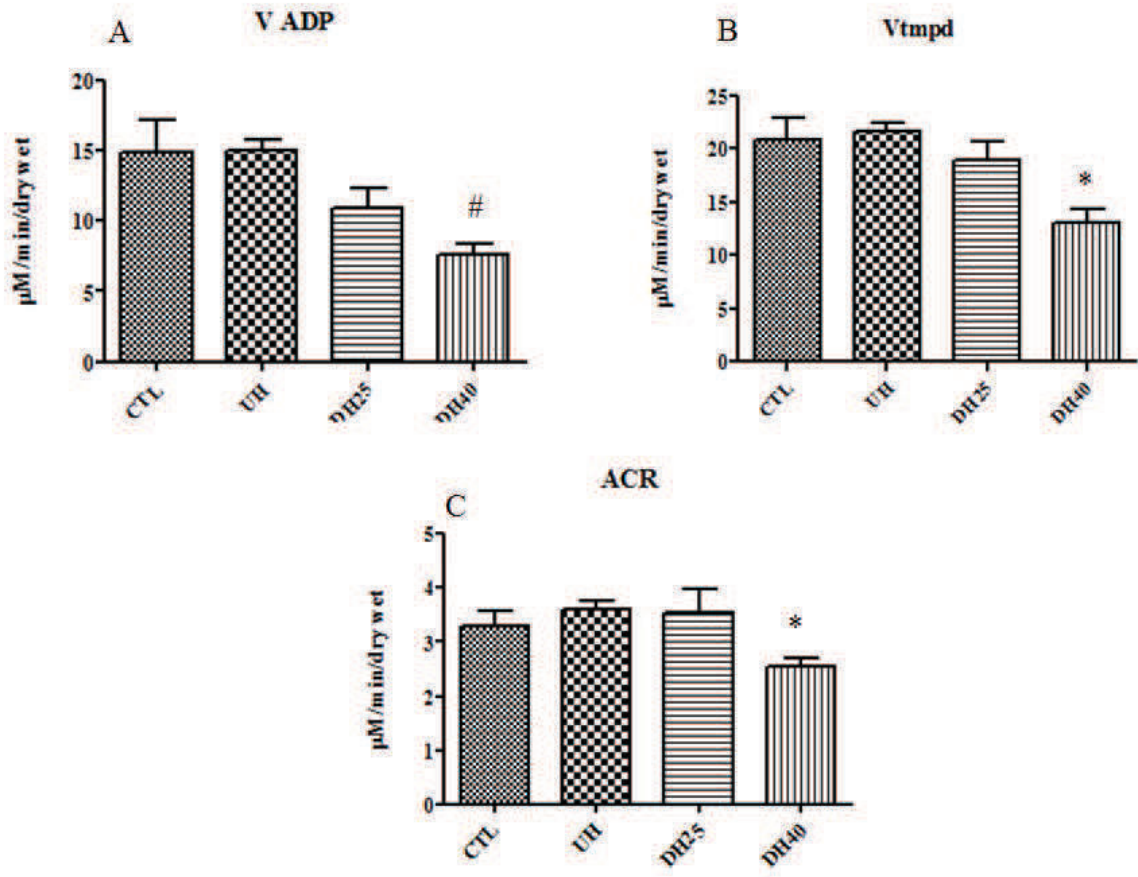


Figure 4



1.4. Principaux résultats

Cette première étude pilote nous a principalement permis de mettre en place un nouveau système de mesure de consommation d'oxygène chez le rat lors d'un exercice triangulaire sur tapis roulant. Pour ce faire, nous avons enregistré la cinétique de VO_2 lors des courses en descente (=excentrique : pente de -15°) ainsi qu'en montée (=concentrique: pente de $+15^\circ$). Au cours d'un test triangulaire maximal (avec incrémentation progressive des vitesses jusqu'à épuisement de l'animal), nos résultats ont montré que pour une même vitesse (35 cm /s), la consommation d' O_2 en excentrique était environ 30% inférieure à celle observée en concentrique. À l'épuisement, la concentration de lactate, ainsi que la production de RLO dans le sang étaient significativement augmentées, mais similaires dans les deux modes d'exercice. La valeur de la production de RLO restait significativement augmentée, 4h et 6h après l'arrêt de l'exercice. Après 24h de récupération, les valeurs du groupe concentrique retombaient à la normale, tandis que celles du groupe excentrique ont diminué 6h après, mais sont néanmoins remontées à une valeur équivalente à celle de fin d'exercice, 24h après.

Sur la base des résultats du test triangulaire maximal, une semaine après, nous avons déterminé les 3 groupes suivants pour réaliser un test rectangulaire sous-maximal de 30min:

1) groupe concentrique (UH, $+15^\circ$) à une vitesse de 25cm/s (80% VO_{2max}) 2) groupe excentrique (DH25, -15°) à une vitesse de 25cm/s (60% VO_{2max}) 3) groupe excentrique (DH40, -15°) à une vitesse de 40cm/s (80% VO_{2max}).

Pour une même vitesse (25cm/s), la concentration de lactate dans le groupe excentrique est de 42% inférieure par rapport au groupe concentrique. Cependant, quand nous nous plaçons au même taux métabolique (80%), il n'y a plus de différence entre les deux modalités d'exercice.

La valeur de la production de RLO dans le sang était augmentée de façon similaire dans les trois groupes, immédiatement après l'exercice. Cependant, elle restait significativement élevée dans le groupe excentrique (DH40cm/s), 4h après, par rapport au groupe concentrique (UH). Tous les groupes retrouvaient leurs valeurs initiales après 24h de récupération.

Pour une même vitesse (25cm/s), la respiration mitochondriale n'était pas diminuée après un exercice en excentrique, cependant, nous avons trouvé une altération de la respiration mitochondriale maximale (VADP), ainsi que l'activité du complexe IV (VTMPD) dans le groupe excentrique (DH40cm/s).

1.5. Conclusion

Concernant la validation de ce nouveau modèle de mesure de la VO_2 à l'aide d'un masque, nous avons pu montrer que la VO_{2max} est proche de ce que l'on peut trouver avec les modèles classiques de mesure de la VO_2 . L'avantage étant ici d'obtenir des cinétiques de VO_2 , ce qui est impossible dans les systèmes de mesures classiques qui nécessite des volumes plus importants et donc un temps beaucoup plus important pour atteindre un niveau stable de consommation de l'oxygène. Ainsi, nous obtenons des signaux stables concernant la cinétique de VO_2 et de CO_2 et le plateau de VO_2 est atteint au bout de 30 secondes à chacun des paliers lors du test triangulaire. Concernant la vitesse de course, il est clair que le masque représente une contrainte supplémentaire pour le rat qui pourrait diminuer sa vitesse maximale.

Lors d'un test triangulaire maximal, nous avons pu démontrer que pour une même vitesse (35cm/s), la consommation d' O_2 en excentrique était clairement inférieure à celle observée en concentrique. Par ailleurs, lors d'un test rectangulaire sous-maximal, pour une même vitesse également (25cm/s), la lactatémie est significativement plus faible en excentrique (DH25, -15°) et il n'y a pas significativement plus de production de RLO, ni d'atteinte mitochondriale par rapport au groupe concentrique (UH, $+15^\circ$).

A même contrainte mécanique, l'exercice en excentrique pourrait présenter clairement un avantage pour les patients atteints de maladies cardio-respiratoires et vasculaires puisque associé à une consommation d'oxygène moindre (60% vs 80% VO_{2max} pour le groupe excentrique vs concentrique, respectivement) sans augmentation de la production de RLO, ni d'augmentation de l'atteinte mitochondriale. Cependant, les atteintes deviennent importantes quand nous nous situons à la même sollicitation métabolique et donc une vitesse plus élevée en excentrique (80% VO_{2max} , associées à des vitesses de 40cm/s vs 25cm/s pour le groupe excentrique vs concentrique, respectivement). Il semble donc important de se placer à une intensité mécanique peu importante, afin de ne pas engendrer de dysfonctions conséquentes,

même s'il est prouvé chez l'homme qu'une habitude conséquente permet d'augmenter au fur et à mesure les charges sans pour autant subir de conséquences néfastes pour le muscle.

CHAPITRE 2. LE DECOUPLAGE MITOCHONDRIALE DIMINUE LES CAPACITÉS À L'EXERCICE, MALGRÉ DES ADAPTATIONS MÉTABOLIQUES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE

2.1. Présentation

La capacité à l'exercice dépend principalement de l'efficacité des systèmes cardio-respiratoires, vasculaires, métaboliques et musculaires. Cependant, actuellement, il n'y a pas de consensus commun sur les facteurs limitant la consommation d'oxygène maximale ($VO_2\text{max}$) (cf chapitre facteurs limitant de la $VO_2\text{max}$). En revanche, plusieurs auteurs ont démontré que les mitochondries du muscle squelettique jouent un rôle crucial pour la détermination de la performance d'endurance et la détermination de $VO_2\text{max}$ (Weibel *et al.*, 1991; Wagner, 1996). En effet, les mitochondries sont des structures subcellulaires qui utilisent l' O_2 pour produire l'ATP nécessaire pour les contractions musculaires (Hoppeler & Flück, 2002). Il est clairement admis dans la littérature, qu'une augmentation de la quantité de mitochondries dans le muscle améliore la capacité à l'exercice chez l'homme (Booth & Thomason, 1991; Zoll *et al.*, 2003). Notre laboratoire et d'autres équipes ont également démontré une amélioration du couplage mitochondrial chez les athlètes (Walsh *et al.*, 2001; Zoll *et al.*, 2002, 2003).

Cependant, l'effet d'une diminution du couplage mitochondrial sur les capacités à l'exercice et les adaptations mitochondriales reste encore inconnu. Ainsi nous avons essayé de mieux comprendre les répercussions d'un traitement pharmacologique par le 2,4-dinitrophénol (DNP), sur le métabolisme musculaire. La mitochondrie contrôle l'activation d'un nombre important de voies de signalisation (production de chaleur, mort cellulaire, stress oxydant, synthèse d'hormones...) et toute dysfonction mitochondriale s'accompagne d'un déséquilibre homéostatique cellulaire, pouvant avoir des répercussions importantes au niveau de l'ensemble des muscles, puis de l'ensemble de l'organisme. Le DNP est un ionophore. Il agit au niveau des mitochondries en provoquant un découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale, en transportant les protons à travers la membrane interne de cet organite, ce qui conduit à une augmentation rapide de la consommation d'oxygène en parallèle d'une faible formation d'ATP (découplage). Au lieu de produire de l'ATP, l'énergie du gradient de protons est dissipée en chaleur. Les cellules compensent la baisse du rendement de production de l'ATP en oxydant davantage les réserves stockées sous forme de glucides et de lipides.

Ceci a pour conséquence d'activer le métabolisme de base de l'organisme et donc d'augmenter la dépense énergétique.

2.2. L'objet de notre étude

- Démontrer le rôle majeur du découplage mitochondrial sur l'état général de l'animal (poids de l'animal, température central, capacités maximales à l'exercice, consommation maximale d'O₂), ainsi que sur la fonction mitochondriale musculaire (biogenèse mitochondriale, fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire, capacités anti-oxydantes, etc...)
- Caractériser la consommation d'oxygène chez des rats traités avec un découplant, aussi bien au repos qu'à l'exercice, ainsi que les capacités à l'exercice des animaux
- Démontrer des adaptations mitochondriales aussi bien qualitativement que quantitativement après un traitement avec le DNP.

2.3. Résultats

Ces résultats font l'objet d'un article publié dans la revue Américaine "Journal of Applied Physiology" en 2014. Cette revue reste la "référence" en ce qui concerne la physiologie de l'exercice.

Mitochondrial uncoupling reduces exercise capacity despite several skeletal muscle metabolic adaptations

J Appl Physiol 116: 364–375, 2014.

Mitochondrial uncoupling reduces exercise capacity despite several skeletal muscle metabolic adaptations

A. I. Schlagowski,^{1,2} F. Singh,¹ A. L. Charles,¹ T. Gali Ramamoorthy,³ F. Favret,^{1,2} F. Piquard,^{1,2} B. Geny,^{1,2} and J. Zoll^{1,2}

¹University of Strasbourg, Faculty of Medicine, FMTS, EA 3072, Strasbourg, France; ²CHRU of Strasbourg, Physiology and Functional Explorations Department, New Civil Hospital, Strasbourg, France; and ³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Department of Physiological Genetics, Illkirch, France

Submitted 25 October 2013; accepted in final form 6 December 2013

Schlagowski AI, Singh F, Charles AL, Gali Ramamoorthy T, Favret F, Piquard F, Geny B, Zoll J. Mitochondrial uncoupling reduces exercise capacity despite several skeletal muscle metabolic adaptations. *J Appl Physiol* 116: 364–375, 2014. First published December 12, 2013; doi:10.1152/jappphysiol.01177.2013.—The effects of mitochondrial uncoupling on skeletal muscle mitochondrial adaptation and maximal exercise capacity are unknown. In this study, rats were divided into a control group (CTL, $n = 8$) and a group treated with 2,4-dinitrophenol, a mitochondrial uncoupler, for 28 days (DNP, 30 mg·kg⁻¹·day⁻¹ in drinking water, $n = 8$). The DNP group had a significantly lower body mass ($P < 0.05$) and a higher resting oxygen uptake ($\dot{V}O_2$, $P < 0.005$). The incremental treadmill test showed that maximal running speed and running economy ($P < 0.01$) were impaired but that maximal $\dot{V}O_2$ ($\dot{V}O_{2max}$) was higher in the DNP-treated rats ($P < 0.05$). In skinned gastrocnemius fibers, basal respiration (V_0) was higher ($P < 0.01$) in the DNP-treated animals, whereas the acceptor control ratio (ACR, V_{max}/V_0) was significantly lower ($P < 0.05$), indicating a reduction in OXPHOS efficiency. In skeletal muscle, DNP activated the mitochondrial biogenesis pathway, as indicated by changes in the mRNA expression of PGC1- α and - β , NRF-1 and -2, and TFAM, and increased the mRNA expression of cytochrome oxidase 1 ($P < 0.01$). The expression of two mitochondrial proteins (prohibitin and Ndufs 3) was higher after DNP treatment. Mitochondrial fission 1 protein (Fis-1) was increased in the DNP group ($P < 0.01$), but mitofusin-1 and -2 were unchanged. Histochemical staining for NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase activity in the gastrocnemius muscle revealed an increase in the proportion of oxidative fibers after DNP treatment. Our study shows that mitochondrial uncoupling induces several skeletal muscle adaptations, highlighting the role of mitochondrial coupling as a critical factor for maximal exercise capacities. These results emphasize the importance of investigating the qualitative aspects of mitochondrial function in addition to the amount of mitochondria.

2,4-dinitrophenol; mitochondrial uncoupling; exhaustive exercise; maximal running speed; gas exchanges; maximal oxygen uptake

EXERCISE CAPACITY DEPENDS to a large extent on the efficiency of the cardiorespiratory, vascular, and muscle metabolic systems. Limiting factors for maximal oxygen uptake ($\dot{V}O_{2max}$) are currently under debate, and a consensus has not been reached. Some authors have concluded that it is the heart's ability to pump blood that imposes limits on maximal oxygen uptake in a physiologically normal individual at sea level (4; for a review, see 49). In that scenario, the capacity of the circulatory system to transport oxygen to muscle mitochondria is the limiting factor defining the upper limit of $\dot{V}O_{2max}$ in humans (8,

10). In contrast, others have claimed that each step in the O₂ cascade is important and, in particular, that the mitochondrial level in skeletal muscle is crucial for the determination of endurance performance, and $\dot{V}O_{2max}$ (52, 57, 58). Indeed, mitochondria are the primary subcellular structures that use O₂ to produce the ATP required for contractile work (29), and the improvement of muscle oxidative capacity (i.e., mitochondrial amount) allows humans and animals to increase their exercise capacity before fatigue occurs (7, 60).

Some *in vivo* studies using magnetic resonance spectroscopy (3) and *ex vivo* studies (55, 60, 61) have shown that endurance capacity requires a close coupling between mitochondrial oxidation and phosphorylation. When metabolic demand increases, it has been suggested that both quantitative (i.e., mitochondrial number) and qualitative (i.e., improvement of mitochondrial function) adaptations occur at the level of the skeletal muscle mitochondria to adjust energy conversion (i.e., ATP production) as a function of ATP consumption, thereby allowing an increase in exercise capacity (34, 60, 61). However, the importance of mitochondrial qualitative characteristics, notably the efficiency of oxidative phosphorylation (OXPHOS) coupling, for determining $\dot{V}O_{2max}$ and maximal exercise capacity are largely unknown (60).

In addition to muscle contractions, mitochondrial respiratory activity can be increased using different strategies, including the enhanced availability of substrates, increased oxidative stress, NO production, and caloric restriction (13, 14, 39). Another strategy could be to trigger mitochondrial uncoupling, resulting in respiration that proceeds without phosphorylation (47, 48). This strategy could help us better understand the importance of mitochondrial OXPHOS efficiency for $\dot{V}O_{2max}$ and maximal running speed. Several natural substances have been described to cause mitochondrial uncoupling (6). Of these, fatty acids are effective uncouplers, but the protein component of the mitochondrial membrane is necessary to facilitate their translocation. It has been suggested that the proteins in question are the so-called uncoupling proteins (UCPs). In brown adipose tissue, UCP1 uncouples respiration from ATP production, reducing the efficiency of mitochondrial coupling but increasing heat production. UCP3 is specifically expressed in skeletal muscle and may play a major role in energy expenditure. It also seems to participate in the determination of mitochondrial efficiency (5, 12). However, the overexpression or knockout mice models used to study mitochondrial uncoupling by UCP3 are controversial (5). Recently, it has been shown in transgenic mice with ectopic expression of UCP1 in skeletal muscle that skeletal muscle mitochondrial uncoupling increases fatty acid oxidation, delays the develop-

Address for reprint requests and other correspondence: J. Zoll, Univ. of Strasbourg, Faculty of Medicine, EA 3072, 11 rue Humann, 67000 Strasbourg, France (e-mail: joffrey.zoll@unistra.fr).

ment of obesity, and increases the median lifespan in mice fed a high-fat diet (32, 33). In addition to the UCPs, Duteil et al. (21) showed that TIF2^{(i)skm-/-} mice, in which TIF2 (a p160 transcriptional coregulator family member) was selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood, have greater energy expenditure due to low skeletal muscle mitochondrial uncoupling, which allows for a reduction in the adverse effects of being sedentary, such as reduced muscle oxidative capacities and type 2 diabetes (21). Despite these findings, no effective pharmacological uncoupling protein agonists have been identified, but artificial uncouplers that efficiently uncouple mitochondria exist. For example, 2,4-dinitrophenol (DNP) allows protons to cross the inner mitochondrial membrane uncoupled to oxidative phosphorylation (26, 41), resulting in increased electron transport and oxygen consumption rates. DNP represents a useful tool for investigating the effects of mild mitochondrial uncoupling on animal energy metabolism, muscle mitochondrial adaptations, and exercise capacities. One study showed that DNP treatment increased mouse longevity, as well as mitochondrial biogenesis, in skeletal muscle following 6 mo of treatment at a very low dose. However, that study did not measure the mitochondrial respiratory parameters or the exercise capacities of the animals (15).

This study was designed to determine whether mitochondrial uncoupling induces metabolic stress (qualitative mitochondrial alterations), thus allowing quantitative mitochondrial adaptations in skeletal muscle that alter maximal oxygen consumption and/or running speed in rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Experiments were performed on adult male Wistar rats (Depré, France) weighing ~400 g. They were housed at a density of 1 individual per cage in a neutral temperature environment (20° ± 2°C) on a 12:12-h photoperiod and were provided food and water ad libitum. All experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication no. 85–23, revised 1996) and were approved by our local ethics committee (CREMEAS). After 2 wk of acclimation and habituation, 12-wk-old male Wistar rats were randomly divided into two groups as follows: the control group (CTL, *n* = 8) and rats treated with the mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol (DNP group, *n* = 8) added to the drinking water. DNP was prepared biweekly and stored in light-protected bottles. Based on water ingestion, the DNP doses were 30 mg·kg⁻¹·day⁻¹, in accordance with the review of Harper et al. (26). DNP did not alter water ingestion at any time point (data not shown). The animals underwent daily weight and temperature measurements, and food and water consumption was recorded daily. A summary of the study design is shown in Fig. 1.

Body temperatures. Rectal temperature was measured daily using a digital thermometer (Beurer, FT 14, Germany). The animals were adapted to rapid and comfortable immobilization and measurements. The temperatures were recorded between 1:00 and 2:00 pm. The room temperature was 20 ± 2°C. The data shown are the average of 5 days of measurements per animal from day 24 (D24) to D28.

Body weight and efficiency of energy conversion. The average body weight of the animals was given every 7 days. Weight gain/ingestion was calculated over the last 7 days of the protocol for each rat.

Gas exchange measurements. To perform the respiratory measurements, a facemask was put over the nose and mouth of each animal and was held in place with a necklace at rest and/or during treadmill running. The incoming airflow rate was maintained at a constant 3 l/min for measurements at rest and 5 l/min during treadmill running.

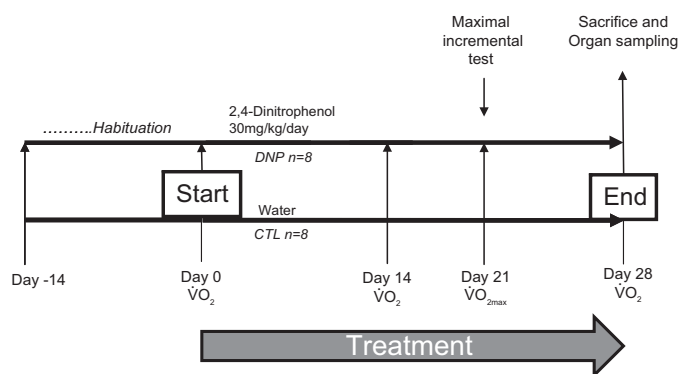


Fig. 1. Study design. Oxygen uptake ($\dot{V}O_2$) evolution and maximal incremental tests were studied in rats. Before beginning the study (day-14), the rats were acclimated to the treadmill work and wore a facemask for respiratory measurements. “Start” indicates the beginning of the 2,4-dinitrophenol (DNP) treatment, and “End” indicates the end of the protocol (28 days after the beginning). $\dot{V}O_2$, oxygen uptake at rest. $\dot{V}O_{2max}$ was measured during the maximal incremental exercise and represents the maximal oxygen consumption of the rats.

The outflowing O₂ concentration and outflowing CO₂ concentration were monitored continuously with O₂ and CO₂ analyzers (Ergocard with Exp’Air software version 1.26.35, Medi-Soft, Dinant, Belgium). The environmental temperature and the barometric pressure were continuously recorded, and the gas values were corrected to STPD (standard temperature and barometric pressure, dry). The signals from the gas analyzers were entered into a computer to calculate oxygen uptake ($\dot{V}O_2$) and carbon dioxide output ($\dot{V}CO_2$) (every 10 s) using standard gas exchange equations. The metabolic rate data were converted to units of milliliters per minute per kilogram.

Gas exchange measurements at rest. Two weeks before starting the experiment, the animals were acclimated to the facemask used for respiratory measurements. The animals were placed in a small cage to prevent any movement. Resting gas exchange was measured by averaging the measurements taken over 20 min. The room temperature was 20 ± 2°C.

Gas exchange measurements during maximal incremental test. Two weeks before starting the experiment, the animals were acclimated to the treadmill exercise with the facemask used for respiratory measurements. Acclimatization consisted of running on the treadmill at 25 cm/s with a 5° incline for 5 min for 3 days/wk. The maximal incremental tests were conducted after 21 days of treatment. After measuring the rectal temperature, the animals were placed on a treadmill (Treadmill Control, Letica, Spain) to measure O₂ consumption and CO₂ production. The incline was set at +5°, and the speed was set at 30 cm/s. The speed was maintained at that rate for 2 min. The speed was then increased by 3 cm/s every 90 s until exhaustion of the animal. The respiratory exchange ratio (RER) was calculated as the ratio of $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$. The $\dot{V}O_2$ data shown are averages of the last 60 s at each running speed. The criterion for exhaustion was a time of 5 s spent on the electrical grid without running. $\dot{V}O_{2max}$ was defined as a $\dot{V}O_2$ value after which an increase in speed did not result in an increase in $\dot{V}O_2$ (22, 23). A respiratory exchange ratio above 1.1 and a blood lactate concentration exceeding 8 mmol/l validated the $\dot{V}O_{2max}$ value. The rectal temperature was measured immediately after exhaustion. Blood samples from the tip of the tail were obtained immediately at the end of exercise to measure blood lactate using a lactate pro-LT device (Lactate Pro LT-1710, ARKRAY). To assess running economy, oxygen uptake was measured at a submaximal exercise intensity obtained from the maximal incremental test results. The submaximal exercise speed was 23.4 m/min (39 cm/s). At this speed, the animals were in a steady state during the last 60 s. Running economy was expressed in milliliters per kilogram per minute. One rat in each group was removed from the results because it did not run

correctly with the mask and did not reach the maximal running speed or the $\dot{V}O_{2\max}$ (maximal lactate <6 mM).

Gas exchange measurements during maximal incremental exercise. $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$ were measured during the maximal incremental test with the same methods as described for the basal condition. The RER was calculated as the ratio of $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$. The $\dot{V}O_2$ data shown are the averages of the last 60 s at each running speed. The maximum value obtained during the maximal test for $\dot{V}O_2$ was defined as the maximal oxygen uptake ($\dot{V}O_{2\max}$; in $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$). $\dot{V}O_{2\max}$ was defined as the maximal $\dot{V}O_2$ measured during the incremental test. The criteria for reaching $\dot{V}O_{2\max}$ were a leveling off of oxygen uptake despite an increased workload, a respiratory exchange ratio above 1.1 and a blood lactate concentration exceeding 8 mmol/l.

Tissue processing. The animals were euthanized at D28, 7 days after the exhaustive exercise, to avoid the acute effects of the exercise test. The rats were anesthetized via an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (0.1 ml/100 g body wt). The superficial part of the gastrocnemius was excised and cleaned of adipose and connective tissues. The muscle was immediately used to study the respiratory parameters.

Glycogen, triglyceride content, and citrate synthase (CS) activity. Muscle samples were prepared for glycogen extraction as previously described (38). Briefly, the samples were homogenized on ice using 10–30 mg/ml tissue in 0.025 M citrate (pH 4.2) containing 2.5 g/l NaF. After centrifugation (15,000 rpm for 5 min), the glycogen content was measured using the EnzyChrom glycogen assay kit (Bioassay Systems). The data are expressed in microgram per milliliter of muscle.

To determine the triglyceride content, 30 mg of tissue was prepared on ice by adding extraction buffer containing 5 volumes of isopropanol, 2 volumes of water, and 2 volumes of Triton X-100. In a 2-ml Eppendorf tube, 50 μl of the extraction buffer was added per milligram of tissue. The samples were vortexed for at least 30 s. After centrifugation (15,000 rpm for 5 min), 10 μl of the clear supernatant was removed for quantifying triglycerides using the commercially available colorimetric-based EnzyChrom triglyceride assay kit (Bioassay Systems). The data are expressed in milligram per deciliter muscle.

Citrate synthase activity was determined according to the method of Zoll et al. (60).

Study of muscle mitochondrial respiration. Thin muscle fibers were isolated in the skinning (S) solution containing (in mol/l) 2.77 CaK₂EGTA, 7.23 K₂EGTA, 6.56 MgCl₂, 5.7 Na₂ATP, 15 phosphocreatine (PCr), 20 taurine, 0.5 DTT, 50 K methanesulfonate, and 20 imidazole (pH 7.1), and they were incubated for 30 min in a solution containing 50 g/ml saponin. Permeabilized fibers were transferred to the respiration (R) solution (the same as the S solution, but containing 3 mmol/l K₂HPO₄ instead of PCr and ATP) for 10 min to wash out adenine nucleotides and PCr. All steps were performed at 4°C with continuous stirring. The respiration of permeabilized muscle fibers was measured by high-resolution respirometry with an Oxygraph-2k respirometer (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) at 37°C, using 3–7 mg tissue (wet weight) in each 2 ml glass chamber (9). This technique ensured the determination of global mitochondrial function, reflecting both the density and the functional properties of the muscle mitochondria (61). Mitochondrial respiration was studied in R solution that contained 2 mg/ml bovine serum albumin (51). Basal mitochondrial respiration (V_0) was measured in the presence of fibers with the substrates glutamate-malate (5 and 2 mM, respectively) and succinate (25 mM). After the determination of V_0 , the maximal fiber respiration rates were measured at 37°C under continuous stirring in the presence of a saturating amount of ADP as a phosphate acceptor (2 mM; V_{\max}). Complex I was stimulated with glutamate-malate and complex II was stimulated with succinate. At the end of the experiment, 50 μM of DNP was added to verify that the maximal respiration rate was obtained with ADP in both groups. The acceptor control ratio (ACR) is defined as V_{\max}/V_0 and represents the degree of coupling

between oxidation and phosphorylation (OXPHOS). After V_0 and V_{\max} measurements, the fibers were dried for 15 min at 150°C. Respiration rates are expressed as picomoles per second per milligram dry weight.

Cell culture and intracellular ATP measurement. To study the effect of DNP in vitro, myoblasts (L6 Woody, ATCC, Rockville, MD) were used. To simulate exercise, cells were incubated with a high concentration of ADP (100 μM), which activates mitochondrial respiration. Cells were grown in monolayers at 37°C in a humidified atmosphere at 5% CO₂ in 20% FCS-DMEM. At 70% confluence, the cells were divided into four groups: 1) control cells (CTL); 2) cells incubated with 50 μM DNP for 24 h (DNP); 3) cells incubated with 100 μM ADP for 24 h (ADP); and 4) cells incubated with 100 μM ADP and 50 μM DNP for 24 h (DNP/ADP). ATP production was measured at the end of the 24-h period using an ATPlite kit according to the manufacturer's instructions (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT). Luminescence was detected using a Victor3 Wallac 1420 multilabel counter (Perkin Elmer).

Histochemical staining of NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase activities. Gastrocnemius muscle tissue was frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane immediately after dissection. For NADH-tetrazolium reductase staining, 10 μm cryosections were incubated in 0.2 M Tris-HCl (pH 7.4), containing 1.5 mM NADH and 1.5 mM nitroblue tetrazolium (NBT) for 15 min at 55°C and washed with three exchanges of deionized H₂O. The unbound NBT was removed from the sections with three washes each of 30, 60, and 90% acetone solutions in increasing and then decreasing concentration. The sections were then rinsed several times with deionized water and mounted with aqueous mounting medium (25).

For SDH staining, 10 μm cryosections were incubated for 1 h in 20 mM potassium dihydrogen phosphate, 76 mM disodium hydrogen phosphate, 5.4% sodium succinate, and 0.02% nitroblue tetrazolium and washed in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) for 5 min, three times. The sections were then postfixed in 10% buffered formalin solution for 10 min, rinsed twice in 15% ethanol for 5 min, and mounted with aqueous mounting medium.

Protein preparation and analysis. Quadriceps muscles were ground in RIPA buffer [50 mM Tris, pH 7.5, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), and protease inhibitor cocktail (45 g/ml, 11 873 580 001, Roche)] in a mortar at 4°C. Homogenates (50 μg of protein) were electrophoresed on 12% polyacrylamide gels. The proteins were electroblotted to Hybond nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences) and immunodetected using primary antibodies directed against Ndufs3 (439200, Invitrogen, 1/1,000), prohibitin (ab28172, Abcam, 1/5,000), and GAPDH (MAB374, Millipore Upstate Chemicon, 1/10,000). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Amersham Biosciences) were detected using an enhanced chemiluminescence detection system (Pierce, Rockford, IL, 1/10,000).

Quantitative real-time polymerase chain reaction (q-RT-PCR). Total RNA was obtained from quadriceps muscle using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD), as previously described (56) and following the manufacturer's instructions. RNA was stored at -80°C until the reverse transcription reaction was performed. cDNA was synthesized from total RNA with the SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) and random hexamer primers. For the real-time PCR reaction, 2 μl of cDNA was used in a final volume of 12 μl containing 10 μM of each primer (sense and antisense), SYBR green (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD) as a fluorescent dye, and H₂O. The real-time PCR measurement of individual cDNAs was performed in triplicate using SYBR green dye to measure duplex DNA formation with the LightCycler System (Roche Diagnostics, Meylan, France). The sequences of the primers were designed using information obtained from the public database GenBank (National Center for Biotechnology Information: NCBI). The sequences of the primer sets are listed in Table 1. The quantifi-

Table 1. List of oligonucleotides used for PCR analyses

Gene	Primer (5'-3')	Gene	Primer (5'-3')
PGC-1 α	CACCAAACCCACAGAGAACAG GCAGTTCAGAGAGTTCACAG	COX-1	CCCAGAGTCATGAGTGAAGGAG CAGGGCGATGAGTACTTCTCGG
PGC-1 β	CCCCAGTGTCTGAAGTGGAT TCTGGAAGTGAAGGCTGGTCT	COX4i-1	GTTGGTACCAGGGCACTTA CACATGAGGCAAGGGGTAGT
NRF-1	GGCCCTTAACAGTGAAGCTG CATCTGGGCCATTAGCATCT	COX4i-2	GGAGGATGACCCCTATGTT GCTGCCCTTCTCTTCTCCT
NRF-2a	TACAATTGACCAGCCTGTGC ATCCTTGGGGACCTTTGAAC	UCP-3	ATCGCCAGGGAAGAAGGAGT TATCGGGTCTTTACCACATCCA
NRF-2b	CCCGATGGACAGCAAGTATT CCGGTTCTCAATTATTCCA	FIS-1	GCACGAGTTTGAATAGGCC CTGCTCCTCTTTGCTACCTTTGG
Tfam	GAAAGCACAATCAAGAGGAG CTGCTTTTCATCATGAGACAG	MFN-1	CCTTGTACATCGATTCTGGGTTC CCTGGGCTGCATTATCTGGTG
CS	TATGGCATGACGGAGATGAA CATGGACTTGGGCCCTTCTA	MFN-2	GATGTCACCACGGAGCTGA AGAGAGCCTCACTCACTTTG

cation of gene expression was conducted using the method described by Liu and Saint (36; using β -actin as an internal control because it is a stable gene for RT-PCR measurements in muscles). The amplification efficiency of each sample was calculated as described by Ramakers et al. (43).

Statistical analysis. The data are presented as means \pm SE. Statistical analyses were carried out using one-way ANOVA. The effects of DNP were evaluated by comparing the data from control rats to DNP rats. The variables for which the one-way ANOVA test indicated a significant difference were also analyzed using a two-way repeated-measures ANOVA, followed by a Tukey post hoc test for intergroup comparisons, to determine changes in body mass, oxygen uptake at rest, $\dot{V}O_2$, and $\dot{V}CO_2$ kinetics (GraphPad Prism 5, GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significance is shown as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

RESULTS

The animals were continuously treated with the uncoupler DNP from D0 to D28 at a concentration of 30 mg·kg⁻¹·day⁻¹ (in drinking water). Our preliminary results have shown that this treatment promotes a mild uncoupling, with an augmentation of baseline $\dot{V}O_2$ (data not shown). Although hyperthermia can occur with high DNP doses (24), the dosage did not affect body temperature in the CTL or DNP groups (37.4 \pm 0.1°C vs. 37.8 \pm 0.1°C, respectively), water consumption (30.4 \pm 2.6 ml vs. 24.8 \pm 1.8 ml, respectively), or food intake (24.3 \pm 0.5 g vs. 23.8 \pm 0.3 g, respectively, Fig. 2, A–C). It is important to note that because the animals were housed at 20°C, extra heat generated due to the uncoupling promoted by

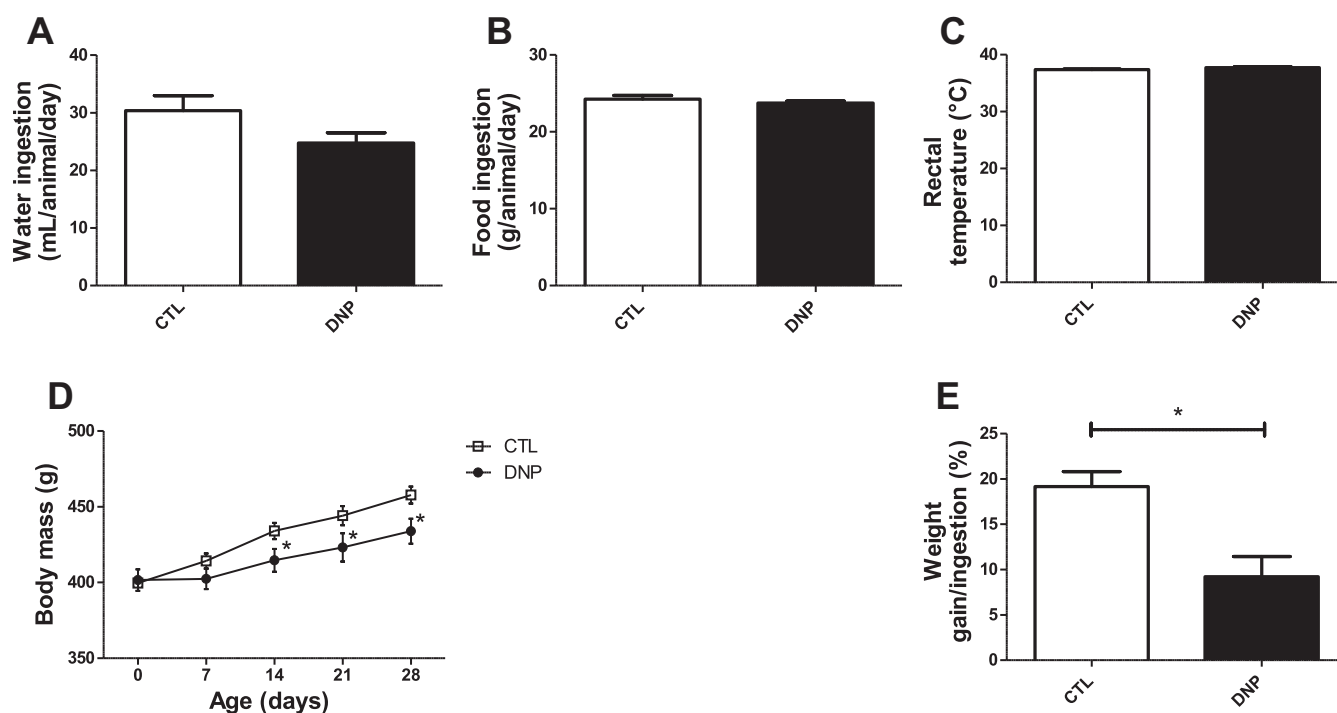


Fig. 2. Rats treated for 4 wk with 2,4-dinitrophenol (DNP) demonstrate less efficient energy conversion. Average water ingestion (ml/animal per day) (A), food ingestion (g/animal per day) (B), and rectal temperature (°C) (C) in the control and DNP groups. From D14 to D28, body mass (D) was lower in the DNP than the CTL group: * $P < 0.05$. E: efficiency of energy conversion was determined by calculating weight gain/ingestion over the final 7 days of the experiment for each animal. Weight gain/ingestion was lower in DNP-treated animals vs. the CTL group (* $P < 0.05$). These results demonstrated the efficiency of DNP treatment as a mild mitochondrial uncoupling agent. CTL, control group (empty bars/symbols); DNP, DNP-treated group (full bars/symbols). Data represent means \pm SE.

DNP could dissipate, thereby preventing hyperthermia. The body mass of the DNP group was significantly lower than the CTL group from D14 (-4.5% ; $P < 0.05$) to D28 (-5.2% ; $P < 0.05$; Fig. 2D). Indeed, weight gain/food ingestion was lower in DNP-treated animals ($19.2 \pm 1.6\%$ vs. $9.2 \pm 2.2\%$ in the CTL and DNP rats, respectively, $P < 0.05$, Fig. 2E). These results suggest that the dosage of DNP used in this study induces a mild mitochondrial uncoupling effect (26).

DNP treatment increases oxygen uptake at rest without any decrease in glycogen and triglyceride content. Oxygen uptake was measured in an open-circuit flow-through system at D0, D14, and D28. Oxygen uptake was significantly higher in DNP rats than in CTL rats from D14 (35.9 ± 1.1 vs. 30.8 ± 1.8 ml·min⁻¹·kg⁻¹, $P < 0.05$) to D28 (35.8 ± 2.2 vs. 27.0 ± 1.3 ml·min⁻¹·kg⁻¹ in DNP and CTL rats, respectively, $P < 0.005$, Fig. 3B). In absolute values, the difference persisted, with a significantly higher oxygen uptake in DNP rats than in CTL rats from D14 (15.4 ± 0.6 vs. 13.2 ± 0.7 ml/min, $P < 0.05$) to D28 (15.4 ± 0.8 vs. 12.9 ± 0.7 ml/min in DNP and CTL rats, respectively, $P < 0.05$; Fig. not shown). CTL rats had an overall reduction in resting $\dot{V}O_2$, which increased over the duration of the experiment in the DNP rats, as shown by the $\dot{V}O_2$ gain calculation ($\dot{V}O_2$ gain = $\dot{V}O_2J_0 - \dot{V}O_2J_{28}$, Fig. 3A). Indeed, the $\dot{V}O_2$ gain was higher in DNP rats than in CTL rats (7.3 ± 2.4 vs. -2.9 ± 2.0 ml·min⁻¹·kg⁻¹, respectively, $P < 0.01$; Fig. 3A). This augmentation of basal oxygen uptake suggested the uncoupling effect of DNP. Basal glycogen concentration was higher in the muscles from DNP-treated animals (94.8 ± 14.7 vs. 139.1 ± 16.1 μg/ml; $P = 0.06$, Fig. 3C), whereas the triglyceride (TG) content was not different between both groups (50.3 ± 1.2 vs. 50.9 ± 1.4 mg/dl in CTL and DNP rats, respectively, Fig. 3D).

DNP treatment decreases maximal exercise capacities but increases $\dot{V}O_{2max}$. At D21, we administered a maximal incremental treadmill test to both groups to test the effects of muscle

mitochondrial uncoupling on the maximal velocity and parameters of $\dot{V}O_{2max}$. Body temperatures were higher after exercise in both CTL and DNP animals (Fig. 4A). The lactate levels were also higher after exercise in both groups, to similar levels (11.6 ± 0.8 and 10.8 ± 1.1 mmol/l in CTL and DNP rats, respectively; Fig. 4B), indicating that both groups of animals underwent exhaustive exercise.

The maximal running speed was reduced in DNP compared with CTL rats (42.4 ± 1.7 vs. 47.6 ± 1.4 cm/s, respectively, -11% , $P < 0.05$; Fig. 4C), whereas the maximal oxygen uptake was higher in the DNP (+9%) than in the CTL group (79.6 ± 1.9 and 73.3 ± 1.6 ml·min⁻¹·kg⁻¹, respectively, $P < 0.05$; Fig. 4D). As shown in Fig. 4E, the ratio of $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$ was higher in the DNP compared with the CTL group (1.2 ± 0.1 vs. 1.0 ± 0.1 ml·min⁻¹·kg⁻¹, respectively, $P < 0.01$). At sub-maximal speed (39 cm/s), the energy expenditure was higher in the DNP group, indicating impaired running economy for DNP-treated animals (3.1 ± 0.1 vs. 3.8 ± 0.2 ml·kg⁻¹·min⁻¹ in CTL and DNP animals, respectively; $P < 0.01$; Fig. 4F). This result indicates that mitochondrial uncoupling impairs the work economy of treated animals.

$\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$ kinetics. The measurement of $\dot{V}O_2$ every 10 s during the incremental test allowed us to calculate the kinetics of O_2 uptake and CO_2 output as a function of the running speed (Figs. 5, A and B) as in humans (18). Oxygen uptake increased as a function of the running speed in both groups. During the first block of the exercise test, the oxygen uptake was higher in DNP (+12.9%) than in CTL rats (58.2 ± 1.3 and 65.7 ± 1.7 ml·min⁻¹·kg⁻¹ in CTL and DNP animals, respectively; $P < 0.01$; Fig. 5A). Moreover, oxygen uptake remained higher in the DNP group until exhaustion (+11.7% at 42 cm/s; 74.2 ± 1.2 and 82.9 ± 2.1 ml·min⁻¹·kg⁻¹ in CTL and DNP animals, respectively; $P < 0.01$). With a running speed of 42 cm/s, the $\dot{V}O_2$ of the DNP group reached a plateau, whereas it increased until exhaustion in the CTL group. The $\dot{V}CO_2$ also increased

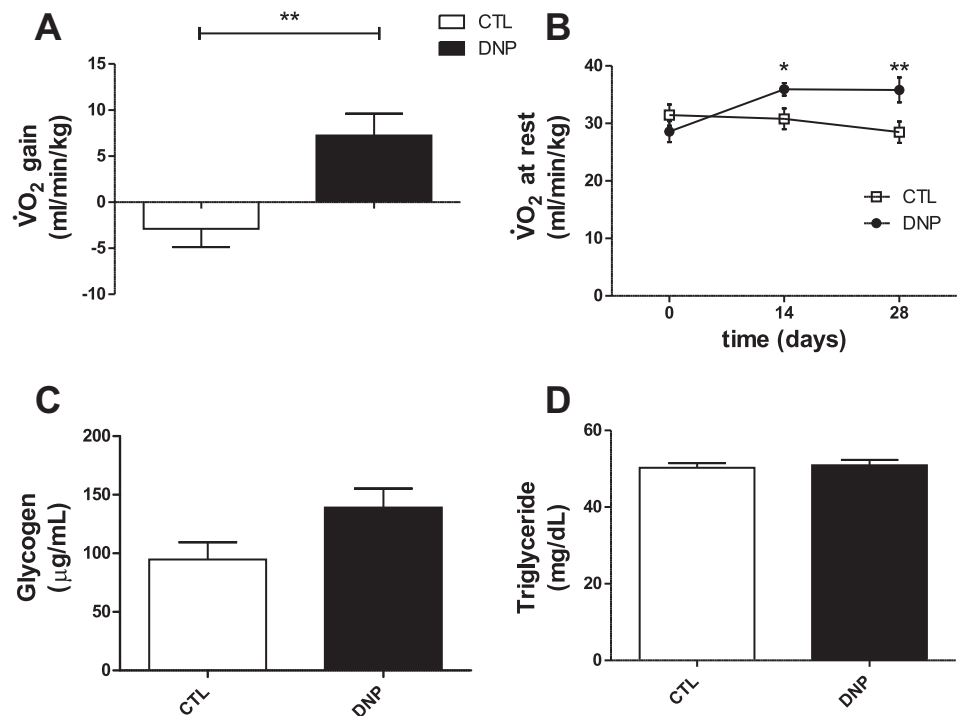


Fig. 3. DNP treatment increases oxygen consumption at rest without a decrease in glycogen and triglyceride content in muscle. Oxygen uptake ($\dot{V}O_2$) was measured in an open-circuit flow-through system. A: increase in the $\dot{V}O_2$ was higher in DNP than in CTL rats after 4 wk of treatment (** $P < 0.01$). B: $\dot{V}O_2$ at rest was higher in DNP rats than CTL rats after 2 wk (* $P < 0.05$) and after 4 wk (** $P < 0.01$). This augmentation of basal oxygen uptake clearly showed the uncoupling effect of DNP. Glycogen (C) was higher in the DNP group, whereas the triglyceride content (D) of the quadriceps muscles after 4 wk of treatment was not different. Control group, empty bars/symbols; DNP-treated group; full bars/symbols. Data represent means \pm SE.

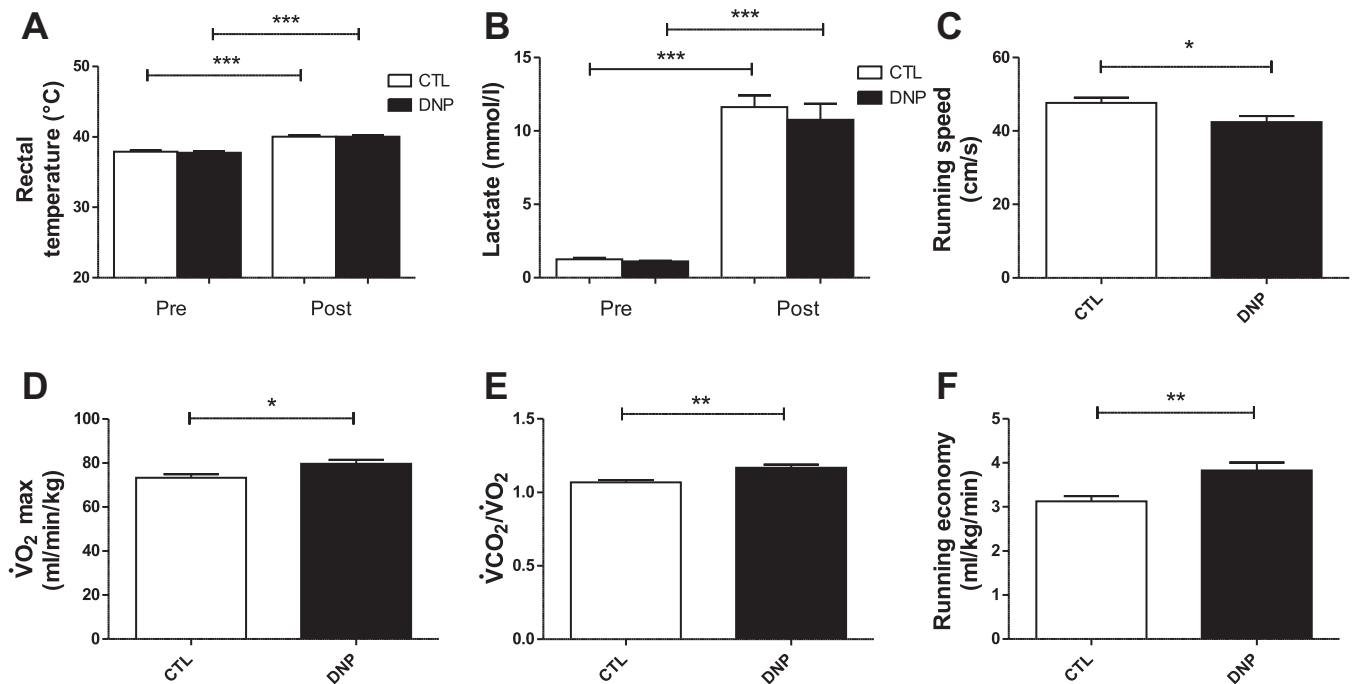


Fig. 4. DNP treatment reduces maximal exercise capacities but increases maximal oxygen uptake ($\dot{V}O_{2\max}$). After 21 days, animals treated or not with DNP performed an incremental treadmill exercise to test the effects of muscle mitochondrial uncoupling on maximal velocity as well as $\dot{V}O_{2\max}$ parameters. Rectal temperature (A) as well as blood lactate (B) increased after exercise to a similar extent in control and DNP animals ($***P < 0.001$). Lactate values after exercise showed that animals underwent exhaustive exercise. The maximal velocity was higher in control than in DNP animals ($*P < 0.05$) (C), whereas the $\dot{V}O_{2\max}$ was higher in the DNP than in the CTL rats ($*P < 0.05$) (D). E: the ratio of $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$ was higher in the DNP group ($*P < 0.01$). F: at 39 cm/s, the energy expenditure was higher in the DNP group, indicating an impaired running economy in DNP-treated animals ($**P < 0.01$). These figures demonstrated the importance of an efficient mitochondrial function to reach maximal exercise capacity. Control group; empty bars/symbols; DNP-treated group, full bars/symbols. Data represent means \pm SE.

from the beginning of the exercise session in the DNP group, whereas the $\dot{V}CO_2$ in the CTL group only increased in the final blocks of the incremental test (Fig. 5B). Then, $\dot{V}CO_2$ remained higher in the DNP group from the beginning at 30 cm/s ($+12.7\%$; 64.9 ± 2.7 and 73.1 ± 3.3 ml \cdot min $^{-1}\cdot$ kg $^{-1}$ in the CTL and DNP groups, respectively) until the 45 cm/s point of the protocol ($+24.5\%$; 79.2 ± 1.6 and 98.5 ± 3.4 ml \cdot min $^{-1}\cdot$ kg $^{-1}$ in the CTL and DNP groups, respectively; $P < 0.005$).

Respiration rates of skinned skeletal muscle fibers. We measured the basal (V_0) and maximal (V_{\max}) respiration rates in skinned fibers from the superficial part of the gastrocnemius muscle. After 4 wk of treatment, the V_0 rate was higher in DNP rats compared with CTL rats [86.9 ± 6.7 and 62.4 ± 2.3 pmol/(s \cdot mg dry weight) respectively, $+38\%$; $P < 0.01$; Fig. 6A].

V_{\max} tended to be higher in DNP animals [137.3 ± 9.7 and 119 ± 6.9 pmol/(s \cdot mg dry weight) in DNP and CTL, respectively, $+15\%$; ns; Fig. 6B]. The addition of DNP after V_{\max} measurement did not increase the respiration rates in the DNP and CTL groups [148.8 ± 10.7 and 122.7 ± 18.3 pmol/(s \cdot mg dry weight) in DNP and CTL, respectively, ns]. The acceptor control ratio (ACR) is defined as V_{\max}/V_0 and represents the coupling between oxidation and phosphorylation. ACR is a good index of mitochondrial respiration efficiency. This parameter was significantly lower (-19%) in DNP animals (1.6 ± 0.1 vs. 1.9 ± 0.1 in the DNP and CTL groups, respectively; $P < 0.05$; Fig. 6C). These results suggest a reduction in oxidative phosphorylation coupling after the DNP treatment. The citrate synthase activity measured in the gastrocnemius muscle was not significantly different between the

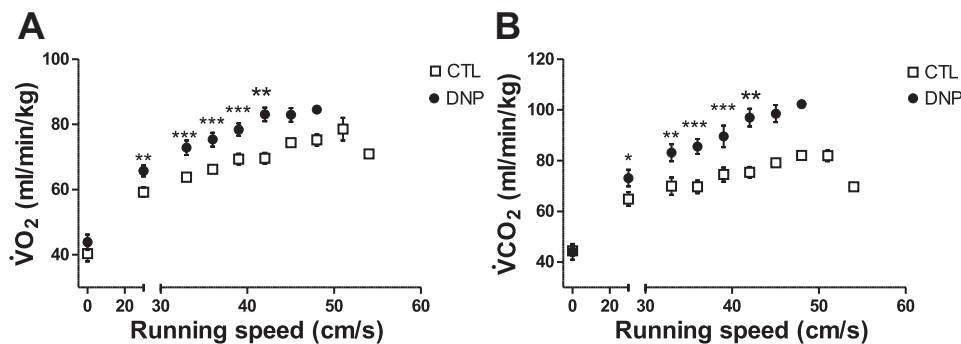


Fig. 5. DNP treatment alters $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$ kinetics during exercise. At D21, animals treated or not treated with DNP were subjected to the maximal incremental treadmill test. The $\dot{V}O_2$ measurement every 10 s allowed for the calculation of the kinetics of oxygen uptake relative to the running speed. A: $\dot{V}O_2$ uptake was higher in DNP than CTL rats running at the speed of 30 cm/s ($**P < 0.01$), 33–39 cm/s ($***P < 0.001$), to 42 cm/s ($**P < 0.01$). B: $\dot{V}CO_2$ was higher in the DNP group running at 30 cm/s ($*P < 0.05$), 33 cm/s ($**P < 0.01$), 36–39 cm/s ($***P < 0.001$), to 42 cm/s ($**P < 0.01$). Control group, empty bars/symbols; DNP-treated group, full bars/symbols. Data represent means \pm SE.

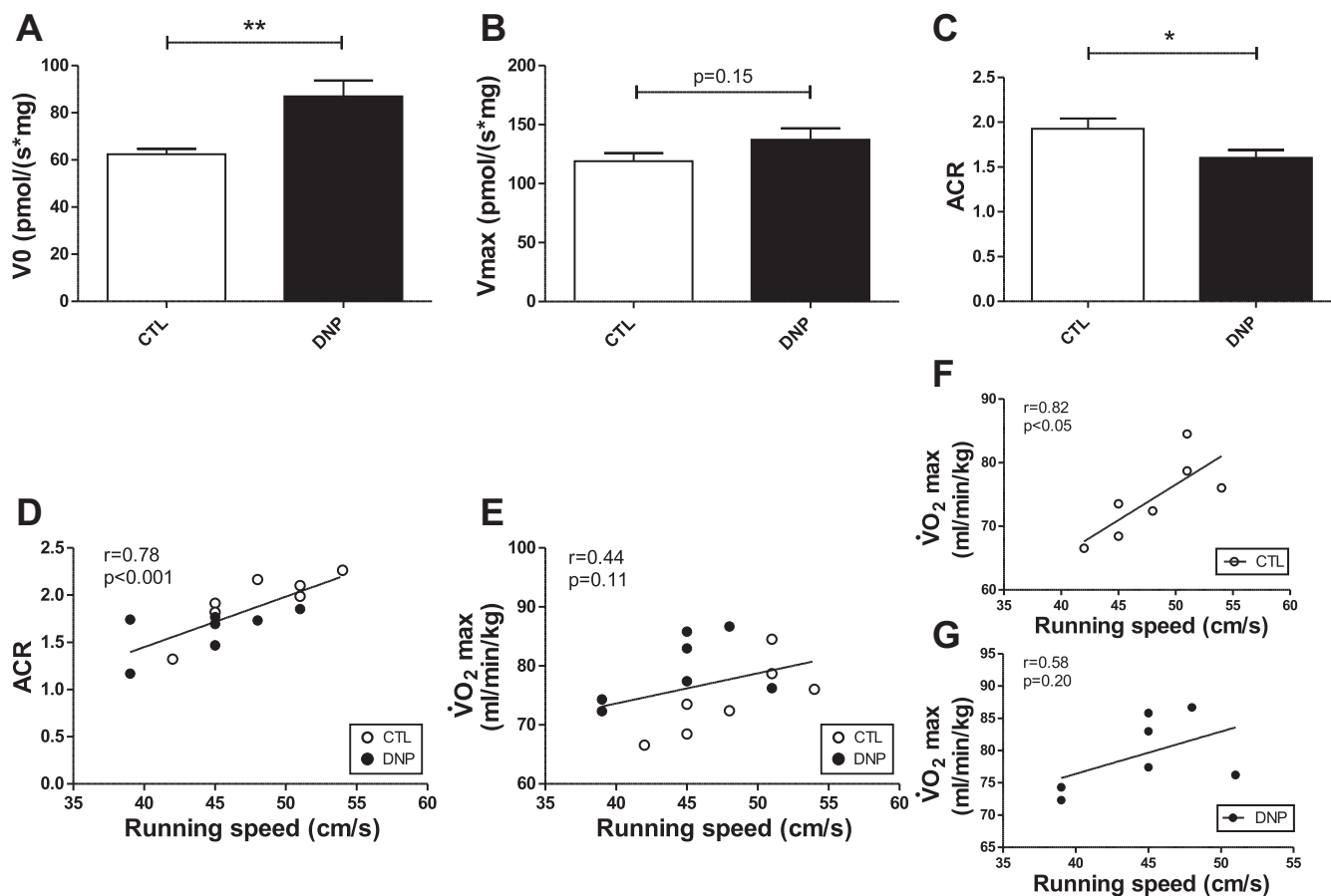


Fig. 6. DNP treatment increases basal (V_0) respiration rates of skinned fibers and reduces the acceptor control ratio (ACR, V_{max}/V_0) of the gastrocnemius muscle. *A*: basal mitochondrial respiration (V_0) in skinned gastrocnemius fibers from untreated and DNP-treated rats (** $P < 0.001$). *B*: maximal mitochondrial respiration (V_{max}) in skinned gastrocnemius fibers from untreated and DNP-treated rats. *C*: acceptor control ratio (ACR, V_{max}/V_0), representing the degree of coupling between oxidation and phosphorylation (* $P < 0.05$). *D*: correlation between the running speed of rats and the ACR of the gastrocnemius muscle ($r = 0.78$; $P < 0.001$). *E*: the correlation between $\dot{V}O_{2max}$ and running speed with untreated and DNP-treated rats ($r = 0.44$; $P = 0.11$). *F*: correlation between $\dot{V}O_{2max}$ and running speed in CTL rats ($r = 0.82$; $P < 0.05$). *G*: correlation between $\dot{V}O_{2max}$ and running speed in DNP-treated rats ($r = 0.52$; $P = 0.20$). Control group, empty bars/symbols; DNP-treated group, full bars/symbols. Data represent means \pm SE.

CTL and DNP rats (5.3 ± 1.14 vs. 3.3 ± 1.0 U/g dry weight, respectively; ns), whereas the ratio between V_{max} [pmol/(s*mg)]/CS activity (U/gPF) was not greater in the DNP group [47.9 ± 12.3 vs. 30.10 ± 5.9 pmol/[s*(U/gPF)]] in the DNP and CTL rats, respectively}. In addition, a strong correlation was observed between the maximal running speed of the rats and the skeletal muscle ACR ($r = 0.78$; $P < 0.001$; Fig. 6D), suggesting the importance of this qualitative mitochondrial parameter for exercise capacity. There was a low correlation between $\dot{V}O_{2max}$ and running speed ($r = 0.44$; $P = 0.11$; Fig. 6E) when the CTL and DNP rats were pooled. This correlation between $\dot{V}O_{2max}$ and running speed became highly significant with the CTL animals alone ($r = 0.82$; $P < 0.05$; Fig. 6F), but not with the DNP animals alone ($r = 0.58$; $P = 0.20$ Fig. 6G), showing that maximal running speed is strongly linked to $\dot{V}O_{2max}$ in CTL rats but not in animals treated with DNP.

Mitochondrial uncoupling following DNP treatment induces skeletal muscle mitochondrial adaptations. The expression of several genes implicated in mitochondrial biogenesis was analyzed by q-RT-PCR in the quadriceps muscle. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 α (PGC-1 α) and PGC-1 β mRNA expression levels were significantly higher after DNP treatment (+330% for PGC-1 α , $P <$

0.05; and +452% for PGC-1 β , $P < 0.01$; Fig. 7). The expression of nuclear respiratory factor 1 (NRF-1), NRF-2a, and -2b, and mitochondrial transcription factor A (TFAM) was significantly higher in the DNP group (+89% for NRF-1, $P < 0.01$; +293% for NRF-2a, $P < 0.05$; +511% for NRF-2b, $P < 0.01$; +304% for TFAM, $P < 0.01$; Fig. 7). For mitochondrial proteins, the mRNA expression of citrate synthase (CS), cytochrome oxidase 4i-1 (COX4i-1), and COX4i-2 were not significantly increased in DNP-treated rats, whereas cytochrome oxidase 1 (COX-1) mRNA expression was clearly augmented in the muscle of DNP animals (+257%; $P < 0.01$; Fig. 7). The expression of uncoupling protein 3 (UCP-3) was lower in the DNP group (-55%; ns). Regarding the mitochondrial dynamic, mitochondrial fission 1 protein (Fis-1), which promotes mitochondrial fission, clearly increased in the DNP group (+507%; $P < 0.01$; Fig. 7), without any significant difference in both groups for mitofusin-1 and -2 (MFN-1 and MFN-2), mitochondrial membrane proteins that participate in mitochondrial fusion.

To quantify the increase in mitochondrial amount in the skeletal muscle, we quantified two mitochondrial proteins in the quadriceps muscle using Western blots (Fig. 8). Prohibitin and NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3

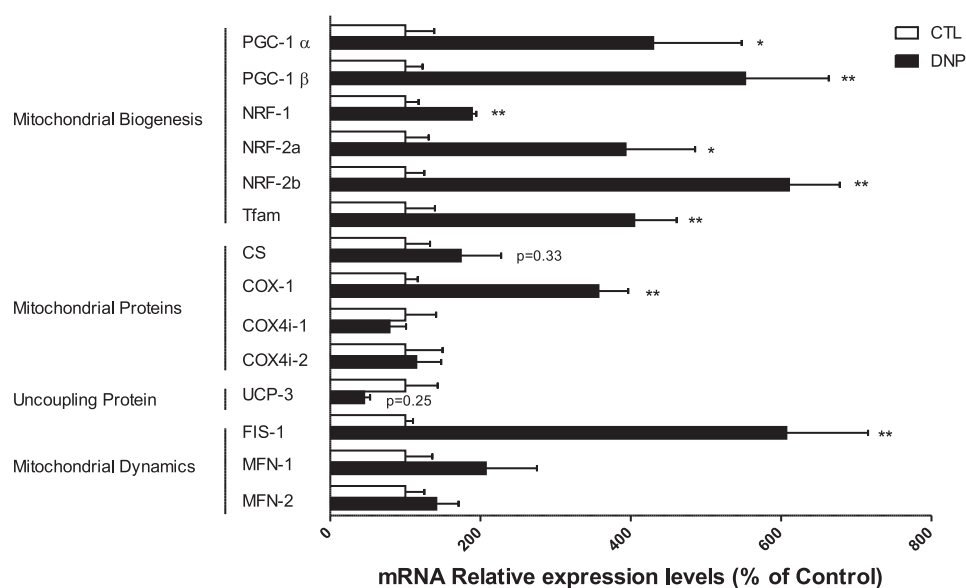


Fig. 7. DNP treatment increases mitochondrial biogenesis and mitochondrial fission. PGC-1 α , PGC-1 β , NRF-1, NRF-2a, NRF-2b, Tfam, CS, COX-1, COX4i-1, COX4i-2, UCP-3, FIS-1, MFN-1, and MFN-2 mRNA expression levels determined by real-time PCR in the quadriceps muscle. PGC-1 α and -1 β , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha and beta; NRF-1, -2a and -2b; nuclear respiratory factor 1, -2a and -2b; Tfam, transcription factor A, mitochondrial; CS, citrate synthase; COX-1, 4i-1, and 4i-2, cytochrome c oxidase mitochondrial-1, subunit 4 isoform -1 and -2; UCP-3, mitochondrial uncoupling protein 3; FIS-1, mitochondrial fission 1; MFN-1 and -2, mitofusin-1 and -2. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Control group, empty bars/symbols; DNP-treated group, full bars/symbols. Data are presented as % of CTL.

and mitochondrial (Ndufs 3) were higher in the DNP group (+27%, $P < 0.05$; and +27%, $P = 0.17$ for prohibitin and Ndufs 3, respectively).

Histochemical staining of the reduced form of NADH dehydrogenase (mitochondrial respiratory complex I) and succinate dehydrogenase (complex II) activities in the gastrocnemius muscle revealed that the proportion of darkly stained oxidative fibers increased after DNP treatment, suggesting the presence of more mitochondria in the DNP group (Fig. 9).

Muscle mitochondrial uncoupling in L6 woody myoblasts. Contractile activity is augmented during exercise testing, thereby increasing ATP consumption. This phenomenon (i.e., the augmentation of cellular and mitochondrial ADP concentration) activates the mechanisms of oxidative phosphorylation

to trigger ATP synthesis. To further understand the mechanisms explaining how skeletal muscle mitochondrial uncoupling affects exercise capacity and oxygen uptake, we used a cell culture model. We used L6 woody myoblasts to determine whether muscle mitochondrial uncoupling could decrease ATP formation under conditions of increased ADP concentration, which mimics the cellular consequences of physical exercise. In the unstimulated condition (without ADP), DNP did not impair ATP production by L6 woody cells (Fig. 10). In the stimulated condition, ATP production was increased in CTL + ADP cells compared with CTL cells ($2.06 \pm 0.17 \mu\text{M}$ vs. $1.54 \pm 0.09 \mu\text{M}$, respectively; $P < 0.01$; +33.8%), showing the stimulation of mitochondrial ATP synthesis when the ADP concentration increases. ATP production was lower in cells exposed to DNP and ADP (DNP + ADP cells) compared with CTL + ADP cells (1.45 ± 0.10 vs. $2.06 \pm 0.17 \mu\text{M}$, respectively, $P < 0.01$; -29.4%), showing that mitochondrial uncoupling decreases mitochondrial capacity to produce ATP in conditions of high ADP concentration.

DISCUSSION

The results of this study show that 1) DNP treatment induces a mild mitochondrial uncoupling that results in the augmentation of basal oxygen uptake and a reduction in weight gain; 2) mild mitochondrial uncoupling induces important skeletal muscle mitochondrial adaptations to compensate for this qualitative mitochondrial impairment; and 3) despite these mitochondrial adaptations, the maximum running speed is reduced, whereas the $\dot{V}O_{2\text{max}}$ of DNP-treated rats increases.

Altogether, this study demonstrates the importance of the functional properties of mitochondria (i.e., mitochondrial OXPHOS coupling) in addition to the amount of mitochondria for the determination of maximal exercise capacity and maximal oxygen uptake.

DNP treatment induced a mild mitochondrial uncoupling. The chronic treatment of rats with the protonophore DNP enables the direct promotion of mitochondrial uncoupling. To our knowledge, no effective pharmacological uncoupling protein agonists have been identified, and the uncoupling activity

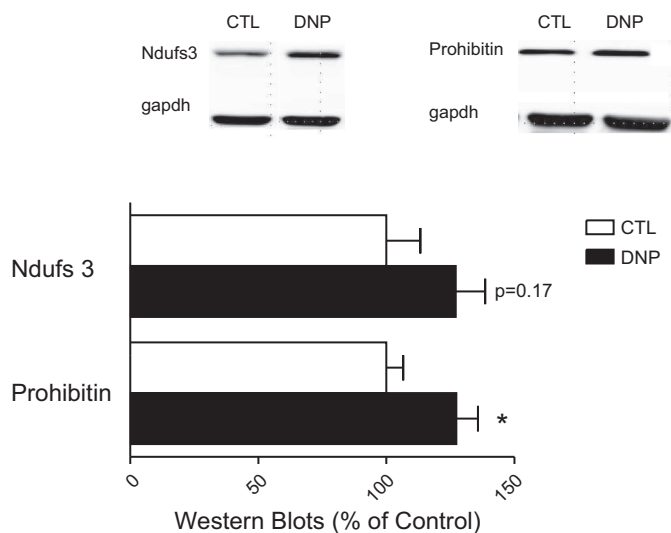


Fig. 8. DNP treatment increases mitochondrial proteins. Proteins used as mitochondrial biogenesis markers were quantified using Western blots in quadriceps muscle. Prohibitin was significantly increased in the DNP group (* $P < 0.05$). Ndufs 3, mitochondrial NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control. Control group; empty bars/symbols; DNP-treated group, full bars/symbols. Data are presented as % of CTL.

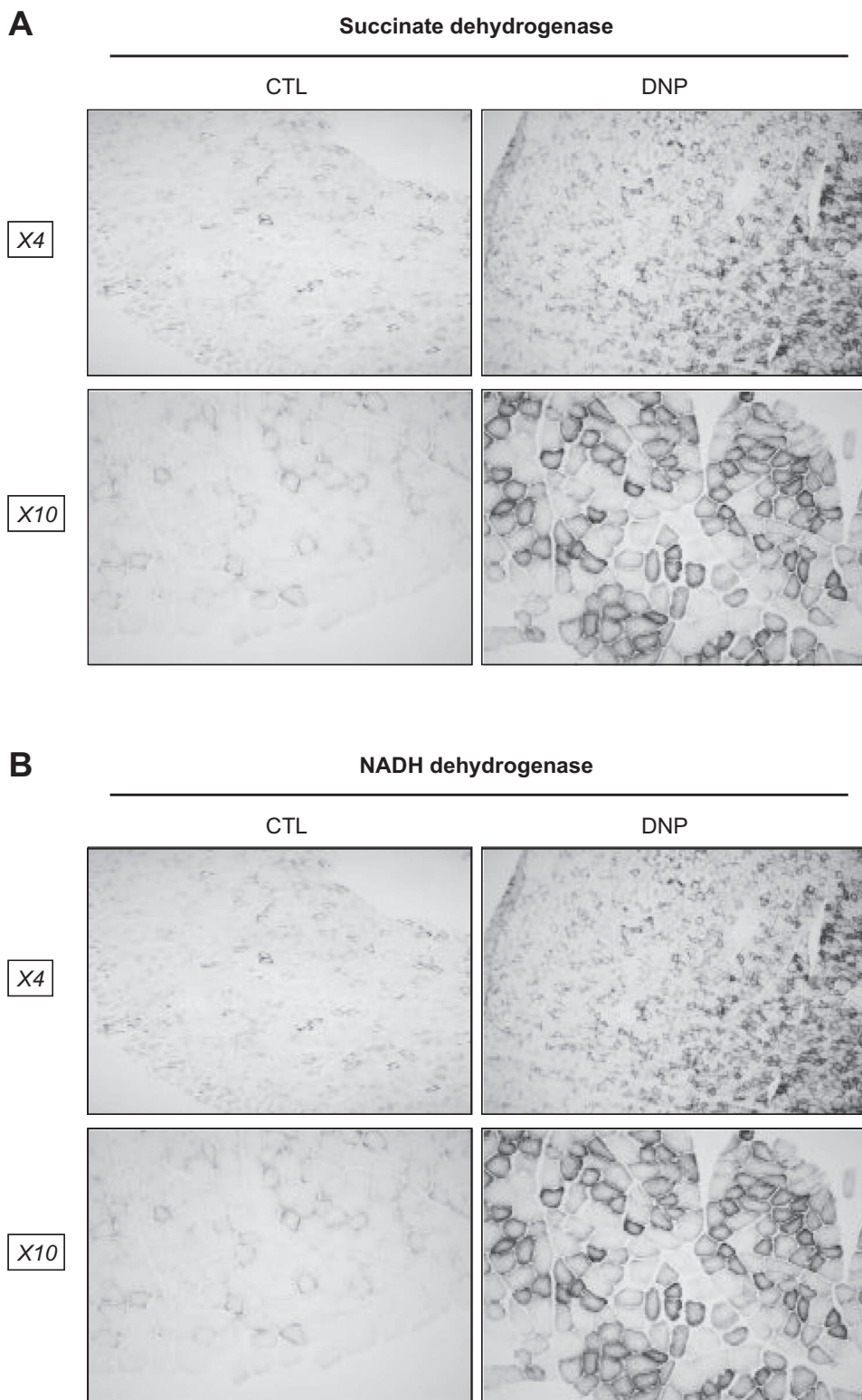


Fig. 9. DNP treatment increases mitochondrial enzymatic activities. Histochemical staining of NADH dehydrogenase (A) and succinate dehydrogenase (B) activity in gastrocnemius muscle. Three different fiber-types are distinguished: oxidative and intermediate fibers are darkly and moderately stained, respectively; glycolytic fibers are unstained.

of UCP3 in muscle remains controversial (17, 46). We delivered the DNP in the drinking water (30 mg·day⁻¹·kg⁻¹) to decrease the efficiency of energy conversion. Indeed, we observed that basal oxygen uptake increased while the weight gain was lower, suggesting that the higher tissue oxygen consumption enhanced substrate oxidation. No hyperthermia in

the basal state was observed. Glycogen and triglyceride stored within striated muscle cells represents a large energy source used during exercise. The results showed no difference in triglyceride content, whereas glycogen content had a tendency to be higher in the skeletal muscle of DNP rats. This could represent an adaptation following DNP treatment, as is the case

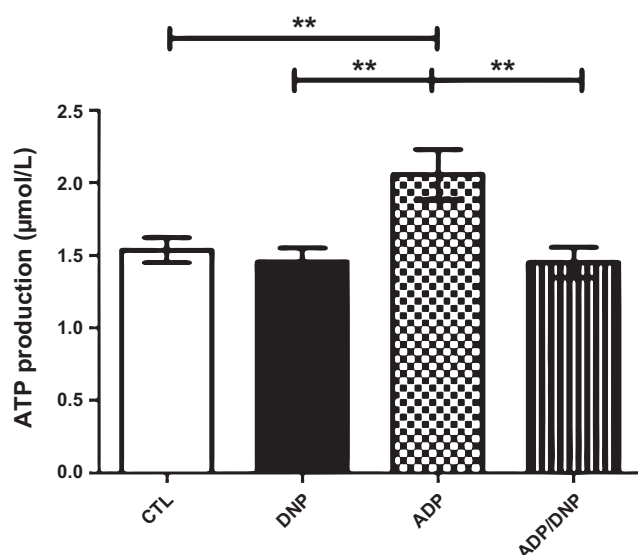


Fig. 10. DNP treatment reduces mitochondrial capacity to produce ATP in the presence of high ADP concentrations in L6 woody myoblasts. In normal conditions (without DNP), ATP production was increased when ADP (100 μ M) was added to the sample (** P < 0.01). When DNP (50 μ M) was coincubated with ADP, ATP production decreased compared with the condition without DNP (** P < 0.01). CTL, cells in normal conditions (without ADP and DNP); DNP, cells incubated with DNP for 24 h (without ADP); ADP, cells incubated with ADP for 24 h (without DNP); ADP/DNP, cells exposed to both ADP and DNP for 24 h.

after an exercise training period in response to the increase in energy demand (28). The small difference in glycogen and TG content between groups and the fact that the incremental test was of very short duration suggest that these biological parameters are unlikely to play a role in the difference in maximal running speed between the groups during the incremental exercise test.

Taken together, these results show that the DNP dose induces moderate and nontoxic mitochondrial uncoupling in Wistar rats, in agreement with previous studies (16, 31, 40).

Mitochondrial uncoupling following DNP treatment induced skeletal muscle mitochondrial adaptations. Our laboratory has previously shown that in skeletal muscle, the coupling between oxidation and phosphorylation (OXPHOS), as calculated from the ACR (V_{\max}/V_0), is higher in athletes than in sedentary people and that endurance training increases this parameter in rats (60, 61). These results suggest that skeletal muscle mitochondrial coupling is an important factor for exercise performance. Recently, it has been shown that the efficiency of ATP production is diminished in the absence of the inner mitochondrial membrane solute transporter (SLC25A25), resulting in a reduction of endurance capacity in animals (1). That work suggests the importance of mitochondrial ATP production for maintaining endurance capacity. In our study we showed that DNP treatment reduced skeletal muscle OXPHOS efficiency. In response to this mitochondrial uncoupling, the mechanisms of mitochondrial biogenesis were clearly activated in muscle, as shown by the increase in mRNA expression of several transcription factors (PGC1 α , PGC1 β , NRF1 and -2, TFAM). This transcription activation was associated with an increase in the expression of two mitochondrial proteins, suggesting an increase in mitochondrial amount in the skeletal muscle fol-

lowing DNP treatment. These results were confirmed by the histochemical staining of NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase activities in gastrocnemius muscle, which clearly increased after DNP treatment. The augmentation of maximal mitochondrial respiration in gastrocnemius muscle corroborates these results.

Mitochondria continually fuse and divide in physiological conditions. Several studies have shown that these processes have important consequences for the morphology, function, and distribution of mitochondria (19, 20). The increase in FIS-1 without any change in mitofusin-1 and -2 at the mRNA level suggests an increase in mitochondrial fragmentation after uncoupling treatment. This finding is in line with an *in vitro* study showing that ionophores, by reducing the mitochondrial membrane potential, cause mitochondrial fragmentation because of an inhibition of mitochondrial fusion (35).

Then, our study clearly demonstrated for the first time that a mitochondrial uncoupling triggered important quantitative mitochondrial adaptations in skeletal muscle, enabling the cells to counteract the qualitative impairments at the level of OXPHOS efficiency. Moreover, these results showed that chronic mitochondrial uncoupling effects mimic the “classical” metabolic effects of exercise training (27, 42, 59), highlighting the importance of mitochondrial coupling for the regulation of muscle metabolism.

Exercise capacity of rats was reduced following DNP treatment. Studies exploring the effects of mitochondrial uncoupling on exercise capacity are scarce. One study showed that DNP exposure for 24 h decreased the swimming endurance of adult zebrafish (37). In this study, we show that DNP treatment reduces the maximal running speed of rats despite the muscle mitochondrial adaptations and the lower weight of DNP animals. Interestingly, the maximal running speed positively correlates with the ACR, suggesting that an impairment of mitochondrial OXPHOS efficiency in skeletal muscle participates in the reduction of the maximal exercise capacities of DNP rats. To better understand the mechanisms implicated in this impairment, we used an *in vitro* cell culture model, and showed that at high ADP concentrations, DNP clearly reduced the mitochondrial capacity of L6 myoblasts to produce ATP. These results suggest that the decrease in mitochondrial capacity to produce ATP following OXPHOS uncoupling could be directly responsible for the impairments of maximal exercise capacity, independent of oxygen availability.

This *in vitro* model had some significant limitations. Indeed, an increase of ADP concentration in the medium of myoblasts in culture does not reflect the complexity of an acute exercise *in vivo*. On the other hand, such an experimental system allows the visualization of the maximal capacity of mitochondria to produce ATP in uncoupling condition, independently of other factors which could influence the mitochondrial function. In the future, it could be interesting to use the combination of electric pulse stimulation as well as mechanical stretch or temporary hypoxia, which might further help to approximate the environment that a fiber of skeletal muscle is exposed to (11).

Maximal oxygen uptake is increased after DNP treatment. During exercise in rats, $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$ were higher, but $\dot{V}CO_2$ increased more than $\dot{V}O_2$ (higher RER), suggesting that CO_2 production by the working muscles was high from the beginning of the exercise period and indicating a large activation of

anaerobic glycolysis due to physical exercise and stress. Indeed, even after habituation, the rats were stressed from the beginning of the exercise to the end, increasing $\dot{V}CO_2$. Even if DNP treatment increased the whole body $\dot{V}O_2$, during exercise, the skeletal muscle mitochondria were activated. When the animals ran at a submaximal speed, running economy ($\dot{V}O_2$ /running speed), which is a good indicator of exercise performance (2, 44, 45), was impaired in DNP animals. Therefore, DNP animals consumed more oxygen while running at a given velocity, showing for the first time that chronic treatment with a chemical uncoupler impaired exercise performance by reducing the running economy of rats.

The higher $\dot{V}O_{2max}$ of DNP treated-rats could be attributed to a greater arteriovenous difference in oxygen content which has been shown by others in work that indicates that the capacity of a portion of the oxygen transport system outside the heart is increased above normal with the same cardiac output (4). Some authors have suggested that the heart's maximal pumping performance imposes the limit on maximal oxygen uptake in humans at sea level (49, 54), especially during exhaustive treadmill exercise that engages large muscle groups. Conversely, others consider that every step of the oxygen pathway contributes to determining maximal oxygen transport, with each step affecting transport almost equally (30, 49, 53, 54). Our results suggest that a higher amount of skeletal muscle mitochondria as well as the uncoupling state of these organelles increased oxygen demand during exercise, enhancing the $\dot{V}O_{2max}$ of DNP rats. Interestingly, we found that maximal running speed was better correlated with $\dot{V}O_{2max}$ in CTL rats than in DNP rats. Thus, whereas in normal conditions $\dot{V}O_{2max}$ is a major parameter for maximal running speed, after DNP treatment, the limiting factor for exercise capacity seems to be at the muscle level and is less dependent on maximal oxygen uptake.

Conclusions. Our results showed for the first time that a reduction in OXPHOS efficiency (qualitative impairment) induced muscle mitochondrial adaptations (quantitative adaptations) to compensate for the reduction in ATP synthesis capacity. However, despite these skeletal muscle adaptations, as well as the improvement in $\dot{V}O_{2max}$, mitochondrial uncoupling reduced maximal exercise capacity, showing the importance of this qualitative parameter for exercise performance. Thus, even if the oxygen transport system is an important parameter that participates in setting the upper limit for exercise performance, this work shows that mitochondrial OXPHOS efficiency significantly participates in this process by altering running economy.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to D. Metzger for a critical reading of the manuscript. We are grateful to J. P. Speich, I. Bentz, F. Goupilleau, M. Marai, and Y. Perez for technical assistance.

We thank S. Zahn of the Department of Ecology, Physiology and Ethology (ROLF) of the disciplinary institute Hubert Curien (IPHC) for providing us with the UCP-3 primer sequences.

The manuscript was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English-speaking editors at American Journal Experts.

GRANTS

We are grateful to the ADIRAL association and the Association for Research in Physiopathology for help in funding the study.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: A.I.S. and J.Z. conception and design of research; A.I.S., F.S., A.L.C., and T.G.R. performed experiments; A.I.S., A.L.C., T.G.R., and J.Z. analyzed data; A.I.S., F.S., A.L.C., and J.Z. interpreted results of experiments; A.I.S. and A.L.C. prepared figures; A.I.S. and J.Z. drafted manuscript; A.I.S., F.F., B.G., and J.Z. edited and revised manuscript; A.I.S., F.F., F.P., B.G., and J.Z. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Anunciado-Koza RP, Zhang J, Ukropec J, Bajpeyi S, Koza RA, Rogers RC, Cefalu WT, Mynatt RL, Kozak LP. Inactivation of the mitochondrial carrier SLC25A25 (ATP-Mg²⁺/P_i transporter) reduces physical endurance and metabolic efficiency in mice. *J Biol Chem* 286: 11659–11671, 2011.
- Bassett DR Jr, Howley ET. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med Sci Sports Exerc* 32: 70–84, 2000.
- Befroy DE, Petersen KF, Dufour S, Mason GF, Rothman DL, Shulman GI. Increased substrate oxidation and mitochondrial uncoupling in skeletal muscle of endurance-trained individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16701–16706, 2008.
- Berglund B, Ekblom B. Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some haematological parameters in healthy men. *J Intern Med* 229: 125–130, 1991.
- Bézaire V, Seifert EL, Harper ME. Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB J* 21: 312–324, 2007.
- Bitkov VV, Khashaev KM, Pronevich LA, Nenashev VA, Batrakov SG. [Effect of berberine, glaucine, staphaglabrine and sanguiritrine on neuromuscular transmission]. *Neurofiziologija* 23: 131–135, 1991.
- Booth FW, Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev* 71: 541–585, 1991.
- Boushel R, Gnaiger E, Calbet JAL, Gonzalez-Alonso J, Wright-Paradis C, Sondergaard H, Ara I, Helge JW, Saltin B. Muscle mitochondrial capacity exceeds maximal oxygen delivery in humans. *Mitochondrion* 11: 303–307, 2011.
- Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsøe R, Dela F. Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 50: 790–796, 2007.
- Boushel R, Saltin B. Ex vivo measures of muscle mitochondrial capacity reveal quantitative limits of oxygen delivery by the circulation during exercise. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 68–75, 2013.
- Burch N, Arnold AS, Item F, Summermatter S, Brochmann Santana Santos G, Christe M, Boutellier U, Toigo M, Handschin C. Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle. *PLoS ONE* 5: e10970, 2010.
- Cadenas S, Buckingham JA, Samec S, Seydoux J, Din N, Dulloo AG, Brand MD. UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett* 462: 257–260, 1999.
- Caillaud C, Py G, Eydoux N, Legros P, Prefaut C, Mercier J. Antioxidants and mitochondrial respiration in lung, diaphragm, and locomotor muscles: effect of exercise. *Free Radic Biol Med* 26: 1292–1299, 1999.
- Cerqueira FM, Cunha FM, Laurindo FRM, Kowaltowski AJ. Calorie restriction increases cerebral mitochondrial respiratory capacity in a NO-mediated mechanism: impact on neuronal survival. *Free Radic Biol Med* 52: 1236–1241, 2012.
- Cerqueira FM, Laurindo FRM, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling and calorie restriction increase fasting eNOS, Akt and mitochondrial biogenesis. *PLoS ONE* 6: e18433, 2011.
- Cherkashyna DV, Tkachova OM, Somov OI, Semenchenko OA, Lebedyn'skyi OS, Petrenko OI. [Effect of 2,4-dinitrophenol on the rat liver respiratory activity and ATP content after hypothermic storage and following reperfusion]. *Ukr Biokhim Zh* 80: 101–105, 2008.
- Costford SR, Seifert EL, Bézaire V, Gerrits M F, Bevilacqua L, Gowing A, Harper ME. The energetic implications of uncoupling protein-3 in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 884–894, 2007.
- Daussin FN, Zoll J, Dufour SP, Ponsot E, Lonsdorfer-Wolf E, Doutreleau S, Mettauer B, Piquard F, Geny B, Richard R. Effect of interval versus continuous training on cardiorespiratory and mitochondrial functions:

- relationship to aerobic performance improvements in sedentary subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R264–R272, 2008.
19. **Detmer SA, Chan DC.** Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J Cell Biol* 176: 405–414, 2007.
 20. **Detmer SA, Chan DC.** Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 870–879, 2007.
 21. **Duteil D, Chambon C, Ali F, Malivindi R, Zoll J, Kato S, Geny B, Chambon P, Metzger D.** The transcriptional coregulators TIF2 and SRC-1 regulate energy homeostasis by modulating mitochondrial respiration in skeletal muscles. *Cell Metab* 12: 496–508, 2010.
 22. **Favret F, Henderson KK, Richalet JP, Gonzalez NC.** Effects of exercise training on acclimatization to hypoxia: systemic O₂ transport during maximal exercise. *J Appl Physiol* 95: 1531–1541, 2003.
 23. **Gonzalez NC, Erwig LP, Painter 3rd CF, Clancy RL, Wagner PD.** Effect of hematocrit on systemic O₂ transport in hypoxic and normoxic exercise in rats. *J Appl Physiol* 77: 1341–1348, 1994.
 24. **Grundlingh J, Dargan PI, El-Zanfaly M, Wood DM.** 2,4-Dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death. *J Med Toxicol* 7: 205–212, 2011.
 25. **Hämäläinen N, Pette D.** The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. *J Histochem Cytochem* 41: 733–743, 1993.
 26. **Harper JA, Dickinson K, Brand MD.** Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obes Rev* 2: 255–265, 2001.
 27. **Hawley JA, Holloszy JO.** Exercise: it's the real thing! *Nutr Rev* 67: 172–178, 2009.
 28. **Hickner RC, Fisher JS, Hansen PA, Racette SB, Mier CM, Turner MJ, Holloszy JO.** Muscle glycogen accumulation after endurance exercise in trained and untrained individuals. *J Appl Physiol* 83: 897–903, 1997.
 29. **Hoppeler H, Flück M.** Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity. *J Exp Biol* 205: 2143–2152, 2002.
 30. **Hoppeler H, Lindstedt SL.** In health and in a normoxic environment, $\dot{V}_{O_{2max}}$ is/is not limited primarily by cardiac output and locomotor muscle blood flow. *J Appl Physiol* 100: 1415–1416, 2006.
 31. **Hudman D, Rainbow RD, Lawrence CL, Standen NB.** The origin of calcium overload in rat cardiac myocytes following metabolic inhibition with 2,4-dinitrophenol. *J Mol Cell Cardiol* 34: 859–871, 2002.
 32. **Keipert S, Ost M, Chadt A, Voigt A, Ayala V, Portero-Otin M, Pamplona R, Al-Hasani H, Klaus S.** Skeletal muscle uncoupling-induced longevity in mice is linked to increased substrate metabolism and induction of the endogenous antioxidant defense system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304: E495–E506, 2013.
 33. **Keipert S, Voigt A, Klaus S.** Dietary effects on body composition, glucose metabolism, and longevity are modulated by skeletal muscle mitochondrial uncoupling in mice. *Aging Cell* 10: 122–136, 2011.
 34. **Kemp GJ, Brindle KM.** What do magnetic resonance-based measurements of Pi → ATP flux tell us about skeletal muscle metabolism? *Diabetes* 61: 1927–1934, 2012.
 35. **Legros F, Lombès A, Frachon P, Rojo M.** Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13: 4343–4354, 2002.
 36. **Liu W, Saint DA.** Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 347–353, 2002.
 37. **Marit JS, Weber LP.** Persistent effects on adult swim performance and energetics in zebrafish developmentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Aquat Toxicol* 106–107: 131–139, 2012.
 38. **Murat JC, Serfaty A.** Simple enzymatic determination of polysaccharide (glycogen) content of animal tissues. *Clin Chem* 20: 1576–1577, 1974.
 39. **Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO.** Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299: 896–899, 2003.
 40. **Nogueira V, Piquet MA, Devin A, Fiore C, Fontaine E, Brandolin G, Rigoulet M, Leverve XM.** Mitochondrial adaptation to in vivo polyunsaturated fatty acid deficiency: increase in phosphorylation efficiency. *J Bioenerg Biomembr* 33: 53–61, 2001.
 41. **Parascandola J.** Dinitrophenol and bioenergetics: an historical perspective. *Mol Cell Biochem* 5: 69–77, 1974.
 42. **Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD.** Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J Physiol* 546: 851–858, 2003.
 43. **Ramakers C, Vos MA, Doevendans PA, Schoenmakers M, Wu YS, Scicchitano S, Iodice A, Thomas GP, Antzelevitch C, Dumaine R.** Coordinated down-regulation of KCNQ1 and KCNE1 expression contributes to reduction of I(Ks) in canine hypertrophied hearts. *Cardiovasc Res* 57: 486–496, 2003.
 44. **Saunders PU, Pyne DB, Telford RD, Hawley JA.** Factors affecting running economy in trained distance runners. *Sports Med* 34: 465–485, 2004.
 45. **Saunders PU, Pyne DB, Telford RD, Hawley JA.** Reliability and variability of running economy in elite distance runners. *Med Sci Sports Exerc* 36: 1972–1976, 2004.
 46. **Schrauwen P, Hesselink M.** Uncoupling protein 3 and physical activity: the role of uncoupling protein 3 in energy metabolism revisited. *Proc Nutr Soc* 62: 635–643, 2003.
 47. **Skulachev VP.** Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363: 100–124, 1998.
 48. **Skulachev VP.** Functions of mitochondria: from intracellular power stations to mediators of a senescence program. *Cell Mol Life Sci* 66: 1785–1793, 2009.
 49. **Spurway NC, Ekblom B, Noakes TD, Wagner PD.** What limits $\dot{V}_{O_{2max}}$? A symposium held at the BASES Conference, 6 September 2010. *J Sports Sci* 30: 517–531, 2012.
 50. **Tiraby C, Tavernier G, Capel F, Mairal A, Crampes F, Rami J, Pujol C, Boutin JA, Langin D.** Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. *Diabetologia* 50: 2190–2199, 2007.
 51. **Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA.** Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 892: 191–196, 1987.
 52. **Wagner PD.** Determinants of maximal oxygen transport and utilization. *Annu Rev Physiol* 58: 21–50, 1996.
 53. **Wagner PD.** A theoretical analysis of factors determining $\dot{V}_{O_{2max}}$ at sea level and altitude. *Respir Physiol* 106: 329–343, 1996.
 54. **Wagner PD.** Insensitivity of $\dot{V}_{O_{2max}}$ to hemoglobin-P50 as sea level and altitude. *Respir Physiol* 107: 205–212, 1997.
 55. **Walsh B, Tonkonogi M, Söderlund K, Hultman E, Saks V, Sahlin K.** The role of phosphorylcreatine and creatine in the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 537: 971–978, 2001.
 56. **Watanabe K, Lambowitz AM.** High-affinity binding site for a group II intron-encoded reverse transcriptase/maturase within a stem-loop structure in the intron RNA. *RNA* 10: 1433–1443, 2004.
 57. **Weibel ER, Hoppeler H.** Exercise-induced maximal metabolic rate scales with muscle aerobic capacity. *J Exp Biol* 208: 1635–1644, 2005.
 58. **Weibel ER, Taylor CR, Hoppeler H.** The concept of symmorphosis: a testable hypothesis of structure-function relationship. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10357–10361, 1991.
 59. **Yan Z, Okutsu M, Akhtar YN, Lira VA.** Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 110: 264–274, 2011.
 60. **Zoll J, Koulmann N, Bahi L, Ventura-Clapier R, Bigard AX.** Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity. *J Cell Physiol* 194: 186–193, 2003.
 61. **Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, Serrurier B, Fortin D, Geny B, Veksler V, Ventura-Clapier R, Mettauer B.** Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 543: 191–200, 2002.

2.4. Principaux résultats

Dans notre étude il s'agissait de mieux comprendre les effets du découplage après plusieurs semaines de traitement au DNP : Les mitochondries musculaires, mais également l'organisme dans son entier, était-il capable de s'adapter face à ce changement du rendement énergétique ?

Nos premiers résultats montraient que les rats traités avec le DNP avaient une prise de poids moins importante, un métabolisme de base qui était augmenté sans pour autant augmenter leur température centrale. A l'exercice, les animaux avaient une augmentation plus importante de leur consommation maximale d'oxygène, malgré une diminution de la capacité maximale à l'exercice, ce qui se traduisait par une consommation énergétique plus importante et une altération de l'économie de course.

Au niveau musculaire, nous avons pu montrer une augmentation de la respiration mitochondriale basale et maximale avec un rendement qui abaissé (diminution de l'ACR qui se traduit par altération de la phosphorylation oxydative suite au découplage). D'autre part les mécanismes de contrôle de la biogenèse mitochondriale étaient clairement activés avec une augmentation de la quantité de protéines et d'enzymes mitochondriales.

2.5. Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que le DNP était capable d'activer le métabolisme de repos et à l'exercice, diminuant la prise de poids des animaux. Notre étude montre que le découplage mitochondrial induisait plusieurs adaptations musculaires squelettiques, en soulignant le rôle du couplage mitochondrial comme un facteur critique pour les capacités maximales d'exercice. En effet, la fonction mitochondriale était clairement modifiée aussi bien qualitativement que quantitativement.

Ces données permettront de mieux comprendre les effets bénéfiques d'un découplage de la mitochondrie sur le muscle squelettique, ouvrant des possibilités dans le domaine du préconditionnement. Ces mécanismes de préconditionnement sont connus pour protéger le cœur et le muscle d'une agression future comme une ischémie critique par exemple. En ce

sens, ces données expérimentales obtenues chez l'animal pourront être utilisées pour la mise en place de projets médicaux de recherche chez l'homme. Il pourrait être envisageable de trouver et tester des produits naturels (comme par exemple les algues vertes) qui provoquent un découplage physiologique, qui pourraient être ensuite utilisés chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires et métaboliques.

CHAPITRE 3. EFFET PROTECTEUR DE L'EXERCICE PHYSIQUE SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE DU MUSCLE SQUELETTIQUE APRÈS ISCHÉMIE-REPERFUSION

3.1. Présentation

L'ischémie musculaire squelettique est souvent la conséquence de l'interruption de la circulation sanguine au niveau du territoire musculaire concerné, ce qui prive les différents tissus de l'apport en oxygène et en éléments nutritifs.

Au niveau des cellules musculaires, l'ischémie-reperfusion est caractérisée par l'association d'une production de radicaux libres, une atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale et une activation de l'inflammation. Dans ces conditions, les muscles squelettiques peuvent subir des lésions d'ischémie-reperfusion dont les conséquences peuvent être aussi bien locales que systémiques. Ces conséquences font que l'ischémie-reperfusion du muscle squelettique peut expliquer la morbidité élevée observée par exemple au décours d'interventions vasculaires lourdes. Du fait de la gravité potentielle de l'ischémie-reperfusion du muscle squelettique, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées. Celles-ci reposent sur la réalisation de cycles courts d'ischémie-reperfusion (d'une durée de quelques minutes au maximum) ou sur l'administration d'une molécule (conditionnement pharmacologique), avant (préconditionnement), pendant (perconditionnement), après (postconditionnement) la période d'ischémie. Alors que quelques études publiées au niveau du muscle cardiaque montrent l'effet bénéfique de l'exercice physique contre les altérations provoquées par l'I-R (pour revue, voir (Domenech, 2006; Vinten-Johansen *et al.*, 2007; Powers *et al.*, 2008), rien n'est à ce jour connu sur la fonction mitochondriale dans le muscle squelettique. L'objectif de notre étude était ainsi de mettre en place un nouveau modèle de preconditionnement et de montrer l'effet protecteur d'un exercice de 30min sur le muscle squelettique via une "pré-activation" mitochondriale.

En effet, quelques études s'intéressant aux effets bénéfiques d'un entraînement physique ont pu constater qu'un stress métabolique induit par l'exercice (consommation des stocks d'ATP, la déplétion en glycogène, augmentation du stress oxydant modéré, etc...) améliore le phénotype métabolique musculaire, notamment au niveau mitochondriale, de façon similaire à un effet hormétique. D'autre part, ils ont observé une augmentation de

l'activité de MnSOD via des cytokines (IL-6 et TNF-alpha) (Yamashita *et al*, 1999), une activation du canal mito-K(ATP) (Quindry *et al.*, 2012), l'activation des "heat shock proteins" (HSP72), ainsi qu'une augmentation du stress oxydant, modifiant certaines protéines et stimulant l'activité des enzymes antioxydantes.

3.2. L'objet de notre étude

Montrer si un préconditionnement *via* un exercice physique peut induire l'activation de mécanismes protecteurs permettant de protéger le métabolisme du muscle squelettique, notamment la fonction mitochondriale du muscle squelettique suite à une période d'I-R. Pour ce faire, nous avons choisi deux groupes de rats (un groupe contrôle, sans exercice avant l'IR et un groupe exercice, réalisant un exercice de 30 min avant l'IR). Nous avons ensuite exploré à la fois la patte postérieure ischémique mais également la patte controlatérale qui représente dans les deux groupes la patte contrôle, pour ensuite analyser:

- La production de lactate
- La respiration mitochondriale dans le muscle squelettique
- La production d'H₂O₂ mitochondriale
- L'activité enzymatique musculaire squelettique

3.3. Résultats

Les résultats font l'objet d'un article en préparation:

Acute exercise preconditioning induced mitochondrial protection against skeletal muscle ischemia-reperfusion injury

Acute exercise preconditioning induced mitochondrial protection against skeletal muscle ischemia-reperfusion injury

Schlagowski AI¹⁻², Singh F¹, Charles AL¹, Isner-Horobeti ME¹⁻⁴, Favret F¹⁻³, Pistea C¹⁻², Piquard F¹⁻², Geny B¹⁻², Zoll J¹⁻²

¹ University of Strasbourg, Faculty of Medicine, FMTS, EA 3072, Strasbourg, France.

² CHRU of Strasbourg, Physiology and Functional Explorations Department, New Civil Hospital, Strasbourg, France.

⁴ CHRU of Strasbourg, Institut Universitaire de Réadaptation Clémenceau

Running title: exercise preconditioning and skeletal muscle mitochondrial function

Key words: exercise; Mitochondria; skeletal muscle

Total number of words: 5826

Name and postal addresses for the corresponding author:

Dr Joffrey Zoll, joffrey.zoll@unistra.fr, University of Strasbourg, Faculty of Medicine, EA 3072, 11 rue Humann, 67000, Strasbourg, France

Abstract

Ischemia-reperfusion (I-R) induces mitochondrial function impairments and oxidative stress in skeletal muscle. In cardiac muscle, one-to-several days of exercise attenuate I-R injury. The objective of the present study was to show that a single exercise (EXO) prior to the I-R period protects the hind limb mitochondrial function. Twenty mice were randomly divided into 2 groups: The control group (CTL I-R, n=10) underwent I-R without exercise and the exercise group (EXO I-R, n=10) ran before I-R. Mice underwent 2 hours of ischemia induced by a rubber band tourniquet applied on the right root of the hind limb (the left leg was used as control leg), followed by a reperfusion period of 2 h. The EXO was performed on a treadmill with 10% incline 1h before I-R. The mice ran at a speed of 30cm until 40cm/sec during 30min. Blood lactate obtained from the tip of the tail at the end of EXO was above 9 mmol/L. In skinned gastrocnemius fibers, I-R significantly decreased the maximal mitochondrial respiration (V_{max}) of the ischemic leg in comparison to the control leg in the CTL group (23.6 vs 28.6 pmol/(sec*mg wet weight); $p < 0.05$). EXO I-R mice increased V_{max} in comparison to CTL I-R mice (39.5 vs 31.8 pmol/(sec*dw) in the ischemic leg and the control leg respectively; $p < 0.05$). After EXO, the impairment between ischemic leg and control leg was partially restored ($p = 0.22$). Without preconditioning, I-R increased H₂O₂ production of the ischemic leg in comparison to the control leg (42.6 vs 37.8 μ mol/mg dw; $p = 0.23$).

EXO I-R mice significantly decreased the H₂O₂ production in comparison to CTL I-R mice (26.6 vs 42.6 μ mol/mg dw; $p < 0.01$) in the ischemic leg. After EXO, the impairment between ischemic leg and control leg was completely abolished ($p = 0.8$).

These results showed that a preconditioning exercise protect the maximal mitochondrial respiration in mice and reduce the mitochondrial production of ROS following a period of I-R.

Introduction

Since the discovery of ischemic preconditioning by Murry *et al.* (Murry *et al.*, 1986), studies have appeared in the literature searching for other preconditioning methods in order to protect muscle against ischemia-reperfusion (I-R) injuries. Physical exercise appeared as a good alternative since it has been shown that acute as well as chronic exercise induced cardiac protection against I-R impairments (for review see (Domenech, 2006; Vinten-Johansen *et al.*, 2007; Powers *et al.*, 2008). On the other hand, studies dealing with exercise preconditioning to counteract I-R induced injuries of skeletal muscle are still lacking.

Restoration of the arterial circulation, although essential to avoid oxygen-deprived cellular necrosis, results in reperfusion-induced skeletal muscle injuries (Pang *et al.*, 1995; Grisotto *et al.*, 2000; Hallström *et al.*, 2002; Primeau *et al.*, 2002). This is a major issue, because skeletal muscles undergoing ischemia and reperfusion are observed in many vascular diseases as well as in complex minimally invasive surgical procedures using laparoscopic or minilaparotomy techniques. A prolonged period of ischemia induced the activation of anaerobic metabolism, whereas the restoration of skeletal muscle perfusion results in oxygen supply in excess that leads to the generation of reactive oxygen species (ROS). ROS are the key initiators of reperfusion injury, which leads to skeletal muscle as well as endothelial injuries and further release of pro-inflammatory cytokines.

At the cellular level, mitochondrial dysfunction following a period of I-R has been largely demonstrated and is mainly characterized by impaired mitochondrial oxidative capacity and premature mitochondrial pore transition permeability opening. Increased oxidative stress secondary to ROS production and clearance imbalance, probably related to enhanced inflammation, appears both to precede and to be enhanced by mitochondrial dysfunction. At the mitochondrial level, skeletal muscle I-R leads to an inhibition of the mitochondrial respiratory chain complexes, which are considered to be the fundamental cellular elements, since impairments of the electron transport chain and oxidative phosphorylation result in a decrease in the levels of ATP and phosphocreatine after 3 h of ischemia (Reimer *et al.*, 1983; Hartung *et al.*, 1985). Moreover, it seems that the recovery of lesions provoked by ischemia depends on mitochondrial integrity (Mittnacht & Farber, 1981). The role of mitochondria also extends far beyond energy production (Hartung *et al.*, 1985) as they are important generators of ROS, which can act either as second messengers or as a source of cellular damage,

depending of ROS production level (Vogt & Farber, 1968; Jennings, 1976; Trump *et al.*, 1976; Mittnacht & Farber, 1981).

Protective strategies have been developed for protection of skeletal muscles from ischemia reperfusion injury, and a beneficial effects of ischemic preconditioning against ischemia-induced damages of the skeletal muscle was reported (Weselcouch *et al.*, 1993; Pang *et al.*, 1995; Gürke *et al.*, 1996; Anon, 1996; Carroll *et al.*, 1997).

At the mitochondrial level, Thaveau *et al.* showed with different experimental models that ischemic preconditioning reduced the impairments of mitochondrial complexes I and II in skeletal muscle (Thaveau *et al.*, 2007; Mansour *et al.*, 2012).

It is well known that exercise induced several beneficial mitochondrial adaptations (Tonkonogi *et al.*, 1999; Zoll *et al.*, 2002) due to the activation of a sophisticated signaling-transcription network (Yan *et al.*, 2011). But even if exercise is known to increase mitochondrial activity by modifying proteins as well as by activating the antioxidant enzymes, the potential beneficial effects of single exercise preconditioning remains unknown in hind limb after a period of ischemia-reperfusion.

The objective of the present study was to show that a single exercise protect the mitochondrial function of gastrocnemius muscle from the deleterious effects of 2 hours of ischemia followed by 2 hours of reperfusion.

Materials and methods

Animals

The study was performed in C57BL/6 mice that were maintained in a thermo-neutral environment of 22 ± 2 °C on a 12-hour day/night cycle and were provided food and water *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication no. 85–23, revised 1996) and were approved by our local ethics committee (CREMEAS).

Study design

After one week of acclimation, the animals were divided into 2 groups: 1) The control group that did not carry out exercise before a period of ischemia-reperfusion (CTL n=10). 2) The exercise group that underwent a treadmill exercise ischemia-reperfusion (EXO n = 10). The EXO group carried out a 30min session of treadmill running 1h before the ischemia-reperfusion period, followed by 30min recovery. Both groups were subjected to 2 hours of ischemia, followed by 2 hours of reperfusion. After that, the animals were sacrificed. Lactate concentration was measured immediately after exercise, immediately before and after ischemia period, as well as at end of reperfusion period (Fig A).

Acute preconditioning exercise

The acute exercise was performed on a treadmill with a slope of + 10 ° (Treadmill Control, Letica, Spain), 1h before the IR period. At the beginning, the speed was maintained at 30cm/sec for 10min and then increased at 35cm/sec until 20min, and then 40cm/sec until 30min. Mice were stimulated to run by an electrical grid. We established the end of exercise after 30min. Blood samples from the tip of the tail were obtained immediately at the end of exercise to measure blood lactate using a lactate pro-LT device (Lactate Pro LT-1710, ARKRAY). After a recovering period of 30min, mice were ready for ischemia-reperfusion protocol.

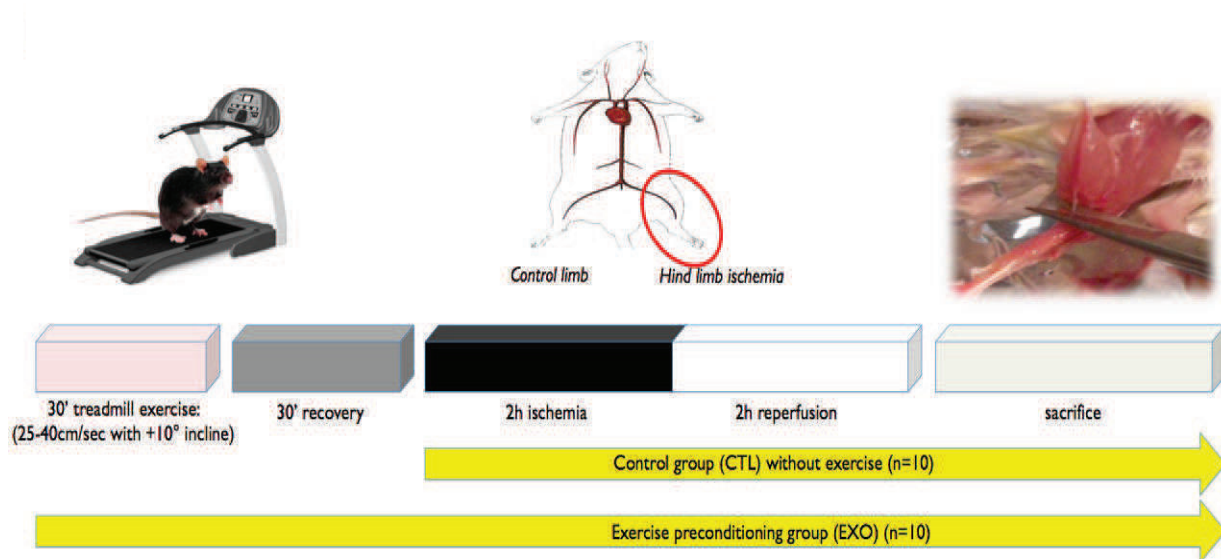


Figure 1: Study design: Mice were divided in 2 groups: The control (CTL n=10) and the exercise preconditioning group that performed an acute exercise 1h before a IR period (EXO n=10).

Preoperative management of ischemia-reperfusion

Mice were placed in a hermetic cage for induction of anesthesia and ventilated with a mixture of 4% isoflurane (CSP, Cournon, France) and oxygen. After induction, mice were placed in supine position on heating blankets (Minerve Esternay, France) with a preselected 35°C temperature maintained during the entire procedure. Spontaneous ventilation was allowed through an oxygen-delivering mask, with concentration of isoflurane maintained at 1.5%.

Surgical procedure of ischemia-reperfusion by a tourniquet

All mice underwent 2 hours of ischemia induced by tourniquet applied to the root of the right hindlimb. As confirmed by Pipinos et al. (Pipinos *et al.*, 2007) the left hindlimb was ischemic (Isch) and the right non exposed to IR, was used as control hindlimb (CTL). Total ischemia was characterized by the absence of an arterial pulse distal to the tourniquet and cyanosis and coldness of the limb. It was also ascertained by capillary lactate measurements on the left foot before unclamping (Lactate Pro device, LT1710; Arkray, KGK, Kyoto, Japan). Lactates are end products of cellular anaerobic energetic metabolism, a key biomarker of tissue hypoxia. A higher concentration than 10mmol/L was considered as ischemic (Mansour *et al.*, 2012).

Mice were sacrificed immediately after IR period. The left (ischemic leg - Isch) and right (non ischemic leg - CTL) gastrocnemius muscle, quadriceps and soleus were harvested. Gastrocnemius muscle samples were dissected for immediate mitochondrial function and H₂O₂ production analysis. The other muscles were cryopreserved for further analysis.

Study of muscle mitochondrial respiration

Thin muscle fibers were isolated in the skinning (S) solution containing (in mol/l) 2.77 CaK₂EGTA, 7.23 K₂EGTA, 6.56 MgCl₂, 5.7 Na₂ATP, 15 phospho- creatine (PCr), 20 taurine, 0.5 DTT, 50 K methanesulfonate, and 20 imidazole (pH 7.1), and they were incubated for 30 min in a solution containing 50 g/ml saponin. Permeabilized fibers were transferred to the respiration (R) solution (the same as the S solution, but containing 3 mmol/l K₂HPO₄ instead of PCr and ATP) for 10 min to wash out adenine nucleotides and PCr. All steps were performed at 4°C with continuous stirring. The respiration of permeabilized muscle fibers was measured by high-resolution respirometry with an Oxygraph-2k respirometer (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) at 37°C, using 3–7 mg tissue (wet weight) in each 2 ml glass chamber (Boushel *et al.*, 2007). This technique ensured the determination of global mitochondrial function, reflecting both the density and the functional properties of the muscle mitochondria (Zoll *et al.*, 2002). Mitochondrial respiration was studied in R solution that contained 2 mg/ml bovine serum albumin (Veksler *et al.*, 1987). Basal mitochondrial respiration (V₀) was measured in the presence of fibers with the substrates glutamate-malate (5 and 2 mM, respectively) and succinate (25 mM). After the determination of V₀, the maximal fiber respiration rates were measured at 37°C under continuous stirring in the presence of a saturating amount of ADP as a phosphate acceptor (2 mM; VADP). Complex I was stimulated with glutamate-malate and complex II was stimulated with succinate. After V₀ and VADP measurements, the fibers were dried for 15 min at 150°C. Respiration rates are expressed as picomoles per second per milligram dry weight.

H₂O₂ production in permeabilized fibers

The permeabilized fiber bundles were placed in ice-cold buffer Z containing 110 mM K-methane sulfonate, 35 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM K₂HPO₄, and 3 mM MgCl₂, 6 mM H₂O, 0.05 mM glutamate, and 0.02 mM malate with 0.5 mg/ml BSA (pH 7.1, 295 mosmol/kg H₂O). Permeabilized fibers remained in buffer Z on a rotator at 4°C until analysis without any deterioration in mitochondrial function. H₂O₂ production was measured with Amplex Red (Invitrogen) which reacted with H₂O₂ in a 1:1 stoichiometry catalyzed by HRP (Horse Radish Peroxidase; Invitrogen) to yield the fluorescent compound resorufin and molar equivalent O₂ (Anderson & Neuffer, 2006; Picard *et al.*, 2008). Resorufin has excitation/emission characteristics of 563 nm/587 nm and is extremely stable once formed. Fluorescence was measured continuously with a Fluoromax 3 (Jobin Yvon) spectrofluorometer with temperature control and magnetic stirring. After baseline (reactants only) was established, the reaction was initiated by addition of a permeabilized fibers bundle to 600 µL of buffer Z containing 5 mM Amplex Red and 0.5 U/ml HRP, with 5 mM glutamate and 2 mM malate for complex I substrate at 37°C.

H₂O₂ production rate was calculated from the slope of $\Delta F/\text{sec}$, after subtracting background, from a standard curve established with the appropriate reaction conditions. At the conclusion of each experiment, fibers were harvested and dried for 15 minutes at 150°C. The results were reported in pmol/min/mg dry weight.

Histological and histochemical staining of NADH dehydrogenase activities

Gastrocnemius tissue was immediately frozen after dissection in liquid nitrogen-cooled isopentane. For NADH-tetrazolium reductase staining, 10 µm cryosections were incubated in 0.2 M Tris-HCl pH 7.4, containing 1.5 mM NADH and 1.5 mM nitrobluetetrazolium (NBT) for 15 min at 55°C and washed with three exchanges of deionized H₂O. Unbound NBT was removed from the sections with three exchanges each of 30, 60 and 90 % acetone solutions in increasing and then decreasing concentration. The sections were finally rinsed several times with deionized water and mounted with aqueous mounting medium (Hämäläinen & Pette, 1993).

The muscle samples were cut into 5mm-thick sections for Hematoxilin-Eosin (H&E) staining, according to standard protocols.

Results

Acute exercise preconditioning decreased lactates after a period of I-R

The lactate level of EXO mice after 30min of treadmill exercise was about $9.2 \text{ mmol/l} \pm 1.2$, indicating an exhaustive high run intensity (Fig. 2). After 30min of recovery, and then just before the period of ischemia (start ischemia), lactate level of EXO mice returned to basal values, not different from SED mice values (4.5 ± 0.5 and $5.4 \pm 0.5 \text{ mmol/l}$ in EXO and SED mice, respectively; Fig. 1). At the end of the ischemic period (end ischemia), lactate level was largely increased in EXO and SED groups (12.9 ± 0.9 and $13.1 \pm 1.6 \text{ mmol/l}$ respectively, $p < 0.001$). After two hours of reperfusion, lactate returned to basal level, however the mean value was lower in EXO group, suggesting a higher capacity to metabolize the lactate in this group (1.2 ± 0.2 and $2.9 \pm 0.5 \text{ mmol/l}$ in EXO and SED mice, respectively; $p < 0.05$).

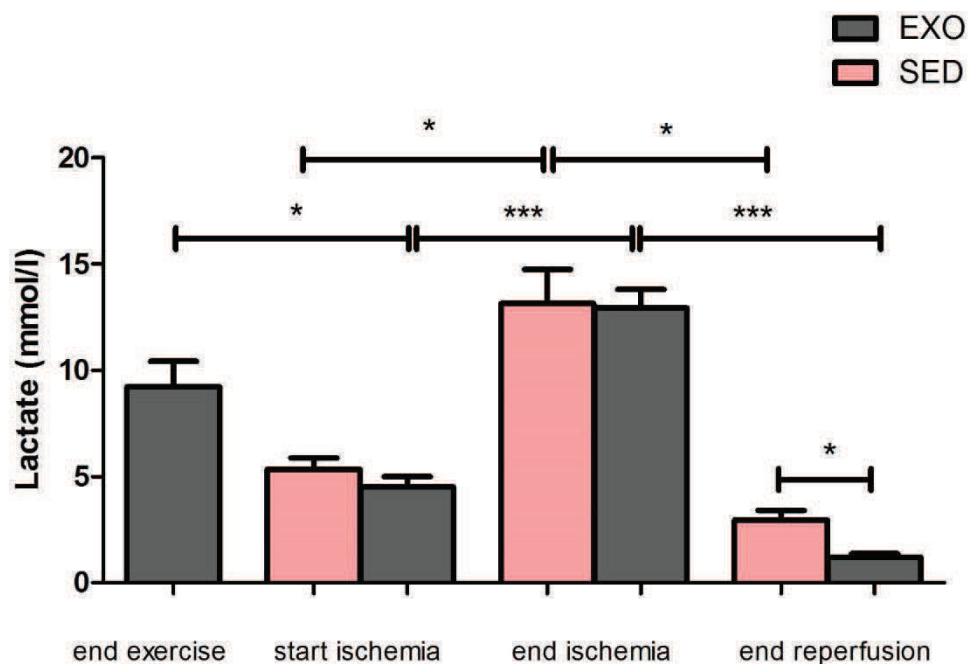
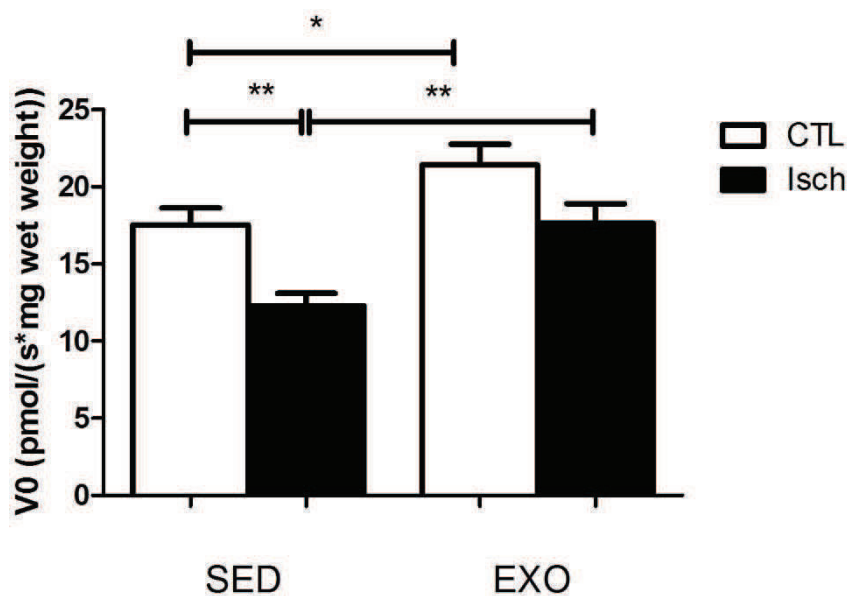


Fig 2: Preconditioning exercise decreased blood lactate after a period of two hours ischemia followed by two hours reperfusion. (End exercise) ; Acute exercise preconditioning increased lactate in EXO mice. (Start ischemia) ; Lactate values at the start of ischemia were similar in both groups. (End ischemia) ; At the end of 2h ischemia, lactates were significantly increased in SED and EXO group (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$). (End reperfusion) ; Preconditioning acute exercise decreased lactate level at the end of reperfusion ($p < 0.05$). SED group, full pink-coloured bars/ symbols; EXO group, full grey-coloured bars/symbols. Data represent means \pm SE.

Exercise preconditioning protected mitochondrial respiration of skeletal muscle from I-R injury.

Mitochondrial respiration measured *in situ* allows characterization of functional mitochondria in their normal intracellular assembly and position, preserving essential interactions with other organelles. We measured the basal (V₀) and maximal (VADP) mitochondrial respiration rates in skinned fibers from the superficial part of the gastrocnemius muscle (fig.3). Concerning the sedentary group (SED), V₀ and VADP relying on complexes I, II, III and IV of the mitochondrial respiratory chain were decreased after a period of two hours ischemia followed by two hours reperfusion (Isch) in comparison with the controlateral gastrocnemius (CTL) muscle (V₀: 12.3 ± 0.8 and 17.5 ± 1.1 pmol/(s*mg wet weight) respectively; p<0.01 and VADP: 28.6 ± 1.4 and 21.9 ± 1.3 pmol/(s*mg wet weight), respectively; p<0.01). Concerning the CTL gastrocnemius muscles, V₀ (+22%; p<0.05) and VADP (+38%, p<0.05) were higher in EXO than in SED mice. Concerning the Isch gastrocnemius muscles, V₀ as well as VADP were higher in EXO group in comparison with SED group (+43% ;p<0.01 and +46%; p<0.05, respectively) showing a protective effect of preconditioning exercise after an Ischemia-Reperfusion period. In muscles of EXO mice, V₀ as well as VADP were not significantly different between Isch and CTL (V₀: 17.6 ± 1.3 vs 21.4 ± 1.3 pmol/(s*mg wet weight), respectively; and VADP: 31.8 ± 3.3 vs 39.5 ± 4.8 pmol/(s*mg wet weight), respectively).



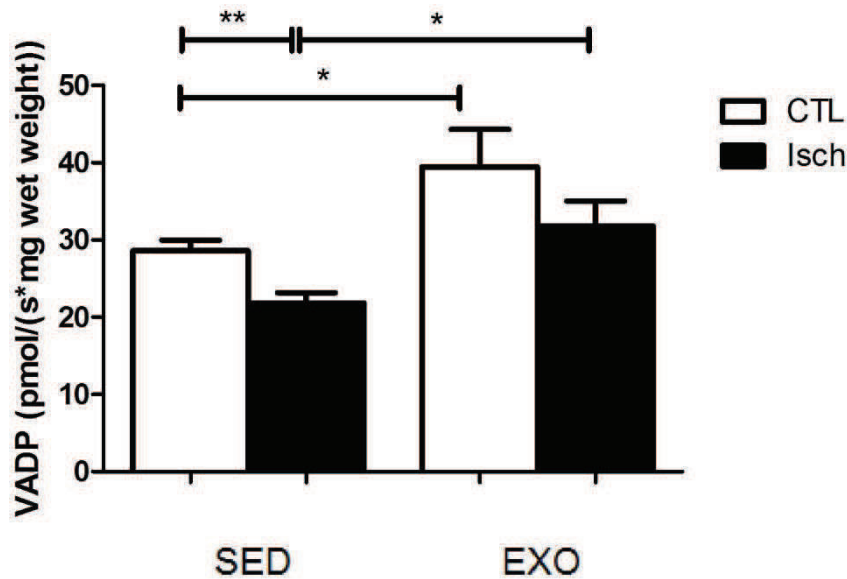


Fig 3: Effect of acute exercise conditioning upstream an ischemia reperfusion (IR) on mitochondrial coupling respiratory chain complexes activities.

Two hours ischemia and 2 hours reperfusion clearly decreased basal (V_0) and maximal (VADP) mitochondrial respiration rates in hind limb muscle (Isch) in comparison to control hindlimb (CTL) (** $p < 0.01$). Acute preconditioning exercise (EXO) significantly increased oxidative capacities in CTL limb ($*p < 0.05$ for V_0 and VADP, respectively) and Isch limb (** $p < 0.01$ for V_0 and $*p < 0.05$ for VADP) in comparison to sedentary mice (SED). SED group, full pink-colored bars/ symbols; EXO group, full grey-colored bars/symbols. Data represent means \pm SE.

Acute exercise preconditioning reduced the Hydrogen Peroxide (H_2O_2) production after a period of hind limb I-R.

We measured the mitochondrial H_2O_2 production in skinned fibres from the superficial part of the gastrocnemius muscle (fig.4). Concerning the SED group, H_2O_2 production had a tendency to be higher in the Isch hind limb in comparison with the CTL skeletal muscle (42.6 ± 3.0 vs 37.8 ± 1.9 pmol/min/mg dry weight, respectively; $p = 0.20$). The H_2O_2 production had a tendency to be lower in CTL skeletal muscle of EXO mice in comparison with the CTL gastrocnemius of SED mice (-26%; $p = 0.18$) (37.8 ± 5.4 vs 26.6 ± 3.1 pmol/min/mg dry weight, respectively), suggesting that a preconditioning exercise reduced the basal mitochondrial ROS production. Interestingly, in the Isch muscles, H_2O_2 production was reduced in muscle of EXO mice in comparison with Isch hindlimb of SED mice. (-38%; $p < 0.01$). Finally, in EXO mice, H_2O_2 production was not different in CTL and Isch hind

limbs showing the protective effects of exercise preconditioning.

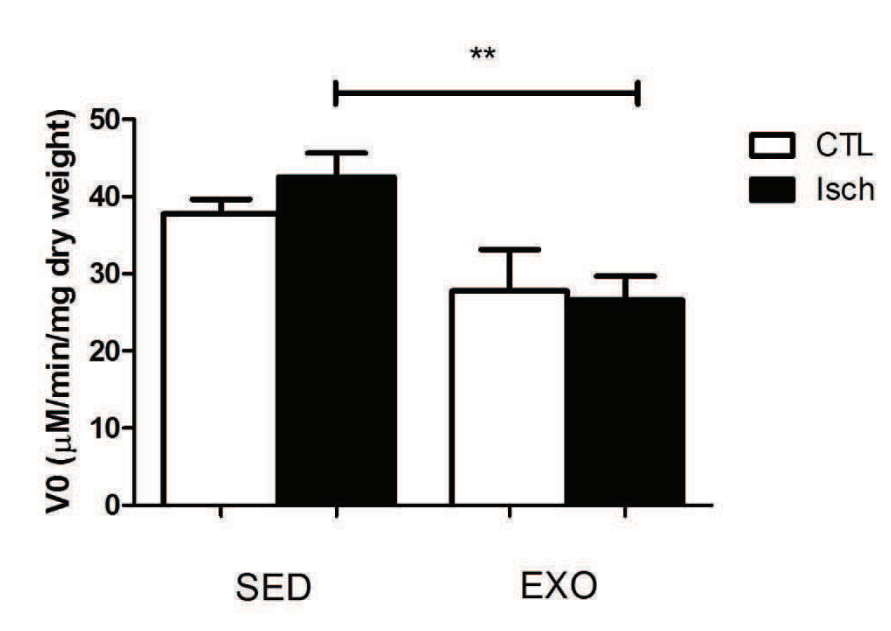


Fig 4: Effect of acute exercise conditioning upstream an ischemia reperfusion (IR) on mitochondrial H2O2 production.

In SED mice, 2 hours ischemia and 2 hours reperfusion clearly increased H₂O₂ production in hind limb ischemia (Isch) in comparison to control limb (CTL). Acute preconditioning exercise (EXO) significantly decreased H₂O₂ production in CTL limb and Isch limb (**p<0.01) in comparison to sedentary mice (SED), indicating a protecting effect of preconditioning exercise upstream an I-R period. SED group, full pink-coloured bars/symbols; EXO group, full grey-coloured bars/symbols. Data represent means ± SE.

Acute exercise preconditioning seems to trigger a metabolic enzymatic activation.

Concerning hematoxylin and eosin staining, Ischemia-Reperfusion seems to increase macrophage infiltration in SED group. Interestingly, acute preconditioning exercise reduced muscle injuries in gastrocnemius muscle, with less infiltration of macrophages (Fig. 5).

Histochemical staining of the reduced form of NADH dehydrogenase (mitochondrial respiratory complex I) activity in the gastrocnemius muscle revealed that the proportion of darkly stained oxidative fibers clearly increased in the EXE group in comparison with the SED group, suggesting the activation of the mitochondrial enzymes in the EXO group.

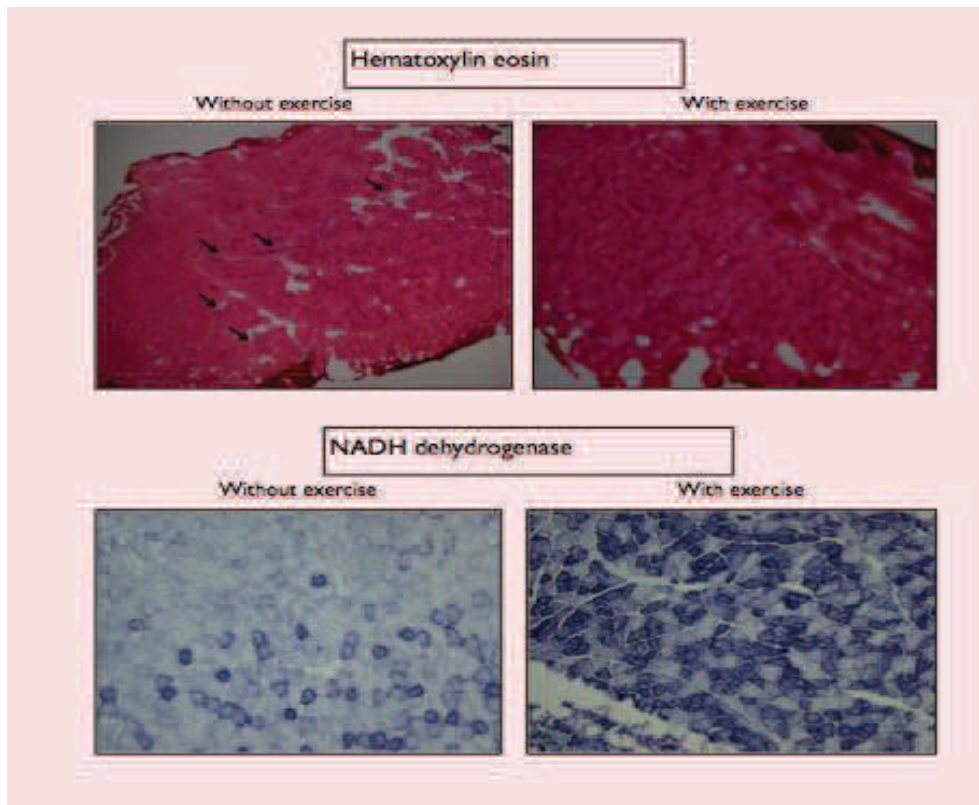


Fig 5: Acute exercise preconditioning before I-R reduced inflammatory cells infiltration and increased mitochondrial enzymatic activities. A) Histochemical Haematoxylin-eosin (HE) staining in gastrocnemius skeletal muscle. Histochemical demonstration of the distribution of inflammatory cells infiltration, which are indicated by the black arrows (original magnification x 40). B) Histochemical staining of NADH dehydrogenase activity. Three different fibre-types are distinguished: oxidative and intermediate fibres are darkly and moderately stained, respectively; glycolytic fibres are unstained.

Discussion

Our results showed that 1) Acute exercise preconditioning protocol improve the recovery of normal lactate level after a period of two hours of ischemia; 2) This phenomenon could be explained by a protective effect this preconditioning protocol on skeletal muscle mitochondrial function (mitochondrial respiration as well as mitochondrial ROS production); 3) A metabolic activation seems to be implicated in the protective preconditioning mechanisms since an increase of a mitochondrial enzyme activity as well as an augmentation of maximal mitochondrial respiration have been shown in the group of mice which carried out the exhaustive exercise. Altogether, acute exercise preconditioning seems to be a good alternative in order to protect skeletal mitochondrial function from the deleterious effects of I-R.

1) Acute exercise preconditioning improve the recovery of normal blood lactate concentration after a period of two hours ischemia followed by two hours reperfusion

Lactate, the end product of cellular anaerobic energetic metabolism, is a key biomarker of tissue hypoxia as well as exhaustive exercise. Firstly, we measured systemic blood lactate in order to validate that our mice performed an exhaustive exercise. This was the case since lactate concentration was superior to 8mmol/l at the end of the treadmill exercise. Lactate concentration came back to the normal value after 30min of recovery, showing that lactate was efficiently metabolize before the beginning of the I-R period. Concerning I-R, because systemic lactate samples are not a good reperfusion biomarker (Noll *et al.*, 2012), we measured local capillary lactate at the ischemic leg level in order to visualize the local effect of I-R. Local lactate concentration was high and not different in SED and EXE mice at the end of the ischemic period, but was more efficiently reduced in EXE mice after the 2 hours of reperfusion, suggesting a better muscular lactate consumption in exercise-preconditioned mice. Because mitochondria participate to the lactate oxidation pathway in muscle, our results suggest a preservation of the mitochondrial capacity to oxidize lactate in skeletal muscles of these mice, helping to reduce the systemic blood lactate. Then, we explored the skeletal muscle mitochondrial function in order to validate this hypothesis.

2) Acute exercise preconditioning prevented the skeletal muscle mitochondrial function from Ischemia-Reperfusion

Measurements of mitochondrial function allow assessment of functional metabolic impairments of skeletal muscle, and the respiratory rate in skinned fibers is a unique means to measure the functional oxidative capacities of the entire mitochondrial population within its cellular environment. As already demonstrated in our laboratory, I-R impaired the mitochondrial function of glycolytic skeletal muscle (for review see (Thaveau *et al.*, 2007, 2010; Talha *et al.*, 2013; Lejay *et al.*, 2014) a muscle mimicking the metabolic characteristics of deconditioned human skeletal muscle (Brandão *et al.*, 2003; Bouitbir *et al.*, 2012).

Several mechanisms may contribute to these IR-induced deleterious effects, even if increased evidence showed the major role played by the increased oxidative stress (Talha *et al.*, 2013; Guillot *et al.*, 2013). Indeed, the mitochondrial electron transport chain is one of the main sources of endogenous ROS, which participated to the oxidative stress injury. Such increase in ROS production, in turn, exacerbates mitochondrial dysfunction and further induces oxidative damage to lipids and proteins, leading to alterations in major cell constituents and apoptosis (Grisotto *et al.*, 2000; Powers *et al.*, 2008).

Interestingly, we showed that acute exhaustive exercise protect the mitochondrial function by preserving the maximal mitochondrial respiration at a level close to normal value. There is large literature showing that regular physical exercise has many health benefits including a lowered threat of all-cause mortality along with a reduced risk of cardiovascular disease, cancer, and diabetes. But to our knowledge, this is the first time that a preconditioning effect of a single exercise has been shown to protect the oxidative metabolism of skeletal muscle. Moreover, this single exhaustive exercise seems to be sufficient to reduce inflammatory cells infiltration as shown in pharmacological preconditioning protocol with cyclosporine (Pottecher *et al.*, 2013). This result suggests that in I-R context, acute exercise could have an anti-inflammatory effect, as already demonstrated for chronic exercise training (for review see (Pinto *et al.*, 2012). Concerning oxidative stress, we found that the mitochondrial H₂O₂ production was lower in I-R skeletal muscle of exercise-preconditioned mice. This result strongly supports the fact that a moderate metabolic stress carried out before I-R is able to reduce the ROS overproduction following I-R. Since exercise reduced IR-induced mitochondrial dysfunction, the resulting reduced oxidative stress could be related, at least in part, to a better functioning of the mitochondrial respiratory chain, thereby reducing ROS overproduction. Because mitochondrial ROS production was also reduced in contralateral gastrocnemius muscle, this suggests that exercise preconditioning reduced the electron leakage from the respiratory chain which lead to anion superoxide formation, improving the OXPHOS efficiency.

3) A metabolic activation seems to be implicated in the protective mechanism of exercise preconditioning

Cellular energetics and homeostasis are challenged during exercise. Our data showed that exercise improved maximal mitochondrial respiration in control animals. This result is in agreement with a previous study of our group showing that maximal respiration is increased after an exhaustive treadmill exercise in rat. In this article, we have suggested that it could be due to a mitochondrial enzyme activation following an increase in mitochondrial calcium concentration (Bouitbir *et al.*, 2011). Here, we also showed with histochemical staining that NADH dehydrogenase activity was largely increased in gastrocnemius muscle of exercise preconditioned-mice. We can hypothesize that exercise induced cellular and molecular homeostasis perturbations leading to enzymatic modifications. Indeed, exercise modifies the redox potential and it has been demonstrated that Mn-SOD is activated when the redox state is altered (Warner *et al.*, 1996).

Several other putative mechanisms to explain preconditioning-induced skeletal muscle protection have been proposed. The principal mechanisms included the induction of heat shock proteins (HSPs), elevation of endoplasmic reticulum (ER) stress proteins, improvement of sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels (sarcoKATP) as well as mitochondrial ATP-sensitive potassium channels (mitoKATP), and improved enzymatic antioxidant capacities. All these mechanisms have been proposed to participate to the beneficial effects of exercise preconditioning in cardiac ischemia-reperfusion (Demirel *et al.*, 2001; Quindry *et al.*, 2012).

Conclusion and perspectives

We showed that exercise induced mitochondrial protection of skeletal muscle against ischemia-reperfusion impairments. These beneficial effects are encouraging in view of their relevance in humans. Indeed, human skeletal muscle impairments are frequent, and they significantly participate in patient morbidity and mortality. In the setting of planned and relatively long periods of ischemia followed by reperfusion, notably in complex invasive surgical procedures such as aortic aneurysm repair and reconstructive surgery with flap tissue transfer (Khouri *et al.*, 1998), a submaximal exercise, or even a six-minute walking distance test, carried out before the intervention could be efficient. This exercise should induce a low metabolic stress, triggering enzymatic, proteins, channels activation which should improve the cellular mechanism of protection. Then, this exercise preconditioning effect represents a new approach for the treatment of many vascular diseases and complex minimally invasive

surgical procedures. On the other hand, the mechanisms responsible for the protection derived by exercise are only partially understood and need future investigations.

Bibliographie

- Anderson EJ & Neuffer PD (2006). Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C844–851.
- Anon (1996). Volume 63, Number 1 (1996), in the article “Preconditioning with Ischemia or Adenosine Protects Skeletal Muscle from Ischemic Tissue Reperfusion Injury,” by H. T. Lee, C. A. Schroeder, Jr., P. M. Shah, S. C. Babu, C. I. Thompson, and F. L. Belloni, pages 29-34. *J Surg Res* 64, 216.
- Bouitbir J, Charles A-L, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J, Piquard F, Geny B & Zoll J (2012). Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a “mitohormesis” mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J* 33, 1397–1407.
- Bouitbir J, Charles A-L, Rasseneur L, Dufour S, Piquard F, Geny B & Zoll J (2011). Atorvastatin treatment reduces exercise capacities in rats: involvement of mitochondrial impairments and oxidative stress. *J Appl Physiol Bethesda Md* 111, 1477–1483.
- Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsøe R & Dela F (2007). Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 50, 790–796.
- Brandão ML, Roselino JES, Piccinato CE & Cherri J (2003). Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J Surg Res* 110, 235–240.
- Carroll CM, Carroll SM, Overgoor ML, Tobin G & Barker JH (1997). Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle-flap survival. *Plast Reconstr Surg* 100, 58–65.
- Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J & Naito H (2001). Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol Bethesda Md* 91, 2205–2212.
- Domenech RJ (2006). Preconditioning A New Concept About the Benefit of Exercise. *Circulation* 113, e1–e3.

- Grisotto PC, dos Santos AC, Coutinho-Netto J, Cherri J & Piccinato CE (2000). Indicators of Oxidative Injury and Alterations of the Cell Membrane in the Skeletal Muscle of Rats Submitted to Ischemia and Reperfusion. *J Surg Res* 92, 1–6.
- Guillot M, Charles A-L, Chamaraux-Tran TN, Bouitbir J, Meyer A, Zoll J, Schneider F & Geny B (2013). Oxidative stress precedes skeletal muscle mitochondrial dysfunction during experimental aortic cross-clamping but is not associated with early lung, heart, brain, liver, or kidney mitochondrial impairment. *J Vasc Surg*; DOI: 10.1016/j.jvs.2013.07.100.
- Gürke L, Marx A, Sutter PM, Frenz A, Salm T, Harder F, Seelig J & Heberer M (1996). Ischemic preconditioning improves post-ischemic skeletal muscle function. *Am Surg* 62, 391–394.
- Hallström S, Gasser H, Neumayer C, Fügl A, Nanobashvili J, Jakubowski A, Huk I, Schlag G & Malinski T (2002). S-Nitroso Human Serum Albumin Treatment Reduces Ischemia/Reperfusion Injury in Skeletal Muscle via Nitric Oxide Release. *Circulation* 105, 3032–3038.
- Hämäläinen N & Pette D (1993). The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 41, 733–743.
- Hartung KJ, Jung K, Minda R & Kunz W (1985). Mitochondrial respiratory function as indicator of the ischemic injury of the rat kidney. *Biomed Biochim Acta* 44, 1435–1443.
- Jennings RB (1976). Relationship of acute ischemia to functional defects and irreversibility. *Circulation* 53, I26–29.
- Khouri RK, Cooley BC, Kunselman AR, Landis JR, Yeramian P, Ingram D, Natarajan N, Benes CO & Wallemark C (1998). A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome. *Plast Reconstr Surg* 102, 711–721.
- Lejay A, Meyer A, Schlagowski A-I, Charles A-L, Singh F, Bouitbir J, Pottecher J, Chakfé N, Zoll J & Geny B (2014). Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 50, 101–105.
- Mansour Z, Charles AL, Bouitbir J, Pottecher J, Kindo M, Mazzucotelli J-P, Zoll J & Geny B (2012). Remote and local ischemic postconditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion. *J Vasc Surg* 56, 774–782.e1.

- Mittnacht S & Farber JL (1981). Reversal of ischemic mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 256, 3199–3206.
- Murry CE, Jennings RB & Reimer KA (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136.
- Noll E, Bouitbir J, Collange O, Zoll J, Charles AL, Thaveau F, Diemunsch P & Geny B (2012). Local but not systemic capillary lactate is a reperfusion biomarker in experimental acute limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 43, 339–340.
- Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B & Forrest CR (1995). Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 29, 782–788.
- Picard M, Godin R, Sinnreich M, Baril J, Bourbeau J, Perrault H, Taivassalo T & Burelle Y (2008). The mitochondrial phenotype of peripheral muscle in chronic obstructive pulmonary disease: disuse or dysfunction? *Am J Respir Crit Care Med* 178, 1040–1047.
- Pinto A, Di Raimondo D, Tuttolomondo A, Buttà C, Milio G & Licata G (2012). Effects of physical exercise on inflammatory markers of atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 18, 4326–4349.
- Pipinos II, Judge AR, Selsby JT, Zhu Z, Swanson SA, Nella AA & Dodd SL (2007). The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction. *Vasc Endovascular Surg* 41, 481–489.
- Pottecher J, Guillot M, Belaidi E, Charles A-L, Lejay A, Gharib A, Diemunsch P & Geny B (2013). Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg* 57, 1100–1108.e2.
- Powers SK, Quindry JC & Kavazis AN (2008). Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 44, 193–201.
- Primeau AJ, Adhihetty PJ & Hood DA (2002). Apoptosis in Heart and Skeletal Muscle. *Can J Appl Physiol* 27, 349–395.
- Quindry JC, Miller L, McGinnis G, Kliszczewicz B, Irwin JM, Landram M, Urbiztondo Z, Nanayakkara G & Amin R (2012). Ischemia reperfusion

- injury, KATP channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 113, 498–506.
- Reimer KA, Jennings RB & Tatum AH (1983). Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol* 52, 72A–81A.
- Talha S, Bouitbir J, Charles A-L, Zoll J, Goette-Di Marco P, Meziani F, Piquard F & Geny B (2013). Pretreatment with brain natriuretic peptide reduces skeletal muscle mitochondrial dysfunction and oxidative stress after ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 114, 172–179.
- Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, N'guessan B, Plobner P, Chakfe N, Kretz J-G, Richard R, Piquard F & Geny B (2010). Effect of chronic pre-treatment with angiotensin converting enzyme inhibition on skeletal muscle mitochondrial recovery after ischemia/reperfusion. *Fundam Clin Pharmacol* 24, 333–340.
- Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, Chafke N, Kretz JG, Piquard F & Geny B (2007). Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 46, 541–547; discussion 547.
- Tonkonogi M, Walsh B, Tiivel T, Saks V & Sahlin K (1999). Mitochondrial function in human skeletal muscle is not impaired by high intensity exercise. *Pflug Arch Eur J Physiol* 437, 562–568.
- Trump BF, Mergner WJ, Kahng MW & Salandino AJ (1976). Studies on the subcellular pathophysiology of ischemia. *Circulation* 53, 117–26.
- Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI & Saks VA (1987). Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 892, 191–196.
- Vinten-Johansen J, Zhao Z-Q, Jiang R, Zatta AJ & Dobson GP (2007). Preconditioning and postconditioning: innate cardioprotection from ischemia-reperfusion injury. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 103, 1441–1448.
- Vogt MT & Farber E (1968). On the molecular pathology of ischemic renal cell death. Reversible and irreversible cellular and mitochondrial metabolic alterations. *Am J Pathol* 53, 1–26.
- Warner BB, Stuart L, Gebb S & Wispé JR (1996). Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am J Physiol* 271, L150–158.

- Weselcouch EO, Sargent C, Wilde MW & Smith MA (1993). ATP-sensitive potassium channels and skeletal muscle function in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 267, 410–416.
- Yan Z, Okutsu M, Akhtar YN & Lira VA (2011). Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md* 110, 264–274.
- Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, Serrurier B, Fortin D, Geny B, Veksler V, Ventura-Clapier R & Mettauer B (2002). Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 543, 191–200.

3.4. Principaux résultats

L'objectif de notre étude était de mettre en place un nouveau modèle de préconditionnement et de montrer l'effet protecteur d'un exercice de 30min sur le muscle squelettique via une "pré-activation" mitochondriale.

Le groupe exercice produisait significativement moins de lactate que le groupe contrôle en fin de la période d'IR, suggérant une meilleure métabolisation de ce produit final du métabolisme énergétique cellulaire anaérobie chez les souris préconditionnées. Ce résultat suggérait un meilleur fonctionnement des mitochondries qui participent à la voie d'oxydation du lactate dans le muscle dans ce groupe de souris.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons exploré la fonction mitochondriale. Tout d'abord, nos résultats ont confirmé qu'une période de 4h d'IR dans le muscle gastrocnémien diminuait de manière significative la respiration mitochondriale maximale de la patte ischémique par rapport à la patte contrôle. Concernant l'effet du préconditionnement par l'exercice, nous avons pu mettre en évidence une protection de la fonction mitochondriale du muscle gastrocnémien ischémique chez les souris ayant effectuées un exercice aigu 30min avant la période d'IR. D'autre part, l'IR a augmenté le stress oxydant (*via* la production d'H₂O₂) dans la patte ischémique, ce qui n'était pas le cas dans le groupe de souris ayant effectué l'exercice de 30min avant l'IR. Les résultats de l'histologie ont clairement montré une activation métabolique sur les coupes du muscle gastrocnémien dans le groupe ayant effectué un exercice avant l'IR. L'exercice aigu semble ainsi suffisant pour protéger le muscle squelettique des effets délétères d'une IR via une "pré-activation" métabolique.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les principaux objectifs de cette thèse étaient de mieux appréhender pourquoi et comment la modulation de la fonction mitochondriale du muscle squelettique à l'aide de différents stimuli (exercice en descente, découplage mitochondrial, préconditionnement par l'exercice) pouvait être un bon moyen thérapeutique pour lutter contre les agressions auxquelles est confronté le muscle squelettique au cours du développement de différents types de pathologies chroniques. Ainsi nous avons proposé trois études expérimentales.

I. 1^{ère} étude: L'exercice en descente permet de maintenir une puissance mécanique importante avec une moindre demande métabolique et sans altérer la fonction mitochondriale du muscle squelettique

Notre objectif était d'une part de mettre au point un nouveau système de mesure de la VO_2 chez le rat et d'autre part, au niveau physiologique, de mettre en évidence la différence de cinétique de VO_2 chez le rat en fonction du type d'exercice et de montrer si ces exercices, pouvaient avoir ou non des effets délétères sur le muscle. Nous avons pu démontrer chez le rat, que pour une même puissance mécanique la consommation en oxygène était plus faible au cours d'un exercice en descente avec donc une moindre sollicitation du système cardiorespiratoire. Ceci pourrait être avantageux chez des patients présentant des pathologies associées à une forte limitation à l'exercice. Nos résultats confirment dans ce modèle animal l'intérêt thérapeutique potentiel représenté par la course en descente, qui utilise essentiellement le mode de contraction excentrique, moins coûteuse en énergie. Toutefois, en raison d'un stress mécanique élevé, ce type d'exercice est encore souvent banni des hôpitaux. Il est donc nécessaire de contrebalancer le "contre" de l'entraînement en excentrique. Nous allons d'abord exposer l'évolution des paramètres physiologiques après un entraînement de ce type, puis parler de ces éventuels effets délétères. Nous terminerons notre discussion par l'intérêt de l'exercice excentrique dans le cadre des pathologies et notamment dans la prévention des affections cardio-vasculaires.

1. L'évolution des paramètres physiologiques après un entraînement en excentrique

De manière générale, la physiologie de la contraction musculaire excentrique reste mal connue à nos jours, cependant il existe des différences significatives entre le mode concentrique et le mode excentrique. Il est connu qu'en parallèle d'une faible consommation

d'oxygène, le travail en excentrique consomme également peu d'ATP. Cependant, la force augmente avec la vitesse de l'étirement et la longueur du complexe musculo-tendineux. Il est aujourd'hui clairement admis que l'exercice excentrique induit indéniablement un stress mécanique (Proske & Morgan, 2001), mais également un stress oxydant via une augmentation de la production de radicaux libres (Lee *et al.*, 2002). Plusieurs études ont établi une relation causale entre les contraintes mécaniques des actions excentriques et les dommages tissulaires ainsi qu'entre la génération de radicaux libres oxygénés (RLO) et les dommages cellulaires. Toutefois, une fois habitué à ce genre d'exercice, on observe une diminution progressive des lésions musculaires. En effet, selon Gibala *et al.*, (Gibala *et al.*, 2000) le nombre de fibres musculaires lésées est plus limité chez l'haltérophile après entraînement régulier (contractions excentriques du biceps). Une raison pour ce phénomène d'adaptation pourrait être l'augmentation du nombre de sarcomères dans la fibre musculaire et par conséquent une augmentation de la surface de cette dernière. Ainsi, la fibre serait plus renforcée lors de l'étirement et moins fragile lors d'une contraction en excentrique (Proske & Morgan, 2001).

Casillas *et al.* ont constaté une amélioration identique en excentrique ainsi qu'en concentrique concernant les paramètres d'aérobies et d'endurance après un réentraînement (Casillas *et al.*, 2007). Cependant, un avantage significatif a été noté pour le paramètre de force musculaire en excentrique. Pour une même charge, les contractions excentriques sont supérieures d'environ 50 % en puissance par rapport aux contractions concentriques. C'est pour cette même raison qu'une mise en place d'exercices excentriques en vue d'une réadaptation et amélioration des capacités physiques à un moindre coût bioénergétique peut paraître judicieuse. Par ailleurs, à même charge mécanique, le travail en excentrique produirait un stress cardiovasculaire et métabolique moins important que l'exercice en concentrique.

2. *Stress cardiovasculaire et métabolique*

Knuttgen *et al.* ont déterminé que la consommation d'oxygène diminuait de 70 à 75 % pour un travail excentrique comparable aux mêmes valeurs de travail concentrique (Knuttgen *et al.*, 1982). Davies & Barnes ont fait des observations semblables, selon lesquelles la marche en descente, à un même niveau d'intensité comparé à du concentrique, demandait seulement 20% de la consommation d'oxygène (Davies & Barnes, 1972). Finalement, Casillas

et al. déterminent la consommation d'oxygène par unité d'activité musculaire, trois fois plus importante durant un travail concentrique que lors d'un même travail en excentrique (Casillas *et al.*, 2007).

Il apparaît que le stress cardiovasculaire et métabolique soit objectivement plus important, à même niveau réel d'effort, avec un exercice concentrique comparativement à un excentrique en termes de douleurs musculaires, d'élévation de la lactatémie et du volume plasmatique ($-11,4 \pm 1,3\%$ pour un exercice CON simple, $-4,6 \pm 0,3\%$ pour un multiexercice CON vs. $-1,6 \pm 1,6\%$ pour un exercice EXC simple et $-1,2 \pm 1,2\%$ pour un multiexercice EXC) (Durand et coll., 2003a) et de la fréquence cardiaque (Kraemer *et al.*, 2003; Durand *et al.*, 2003).

Les données montrent que des exercices en excentrique avec des protocoles simples et multiexercices produisent moins de stress cardiovasculaire à la même charge de travail absolu que l'exercice en concentrique. Nos résultats obtenus lors d'un test rectangulaire sous-maximal correspondent parfaitement aux valeurs obtenues dans la littérature. En effet, nous avons démontré que pour une même vitesse de course sur tapis roulant (25cm/s), la lactatémie était significativement plus faible en excentrique (DH25, -15°) et il n'y avait pas significativement plus de production de RLO, ni d'atteinte mitochondriale par rapport au groupe concentrique (UH, $+15^\circ$). Cependant, également concordant avec la littérature, nous avons mis en évidence des atteintes plus importantes quand nous nous situons à la même sollicitation métabolique et donc à une vitesse plus élevée en excentrique (80% VO_2 max, associée à des vitesses de 40cm/s vs 25cm/s pour le groupe excentrique vs concentrique.). Quant à la réalisation de protocoles en excentrique, il est donc important de se placer à une intensité mécanique peu importante, afin de ne pas engendrer de dysfonctions conséquentes. Selon les résultats de notre étude chez le rat, une vitesse se situant aux alentours de 25cm/sec (60% VO_2 max) pendant 30min avec une pente de -15° serait tout à fait envisageable. En termes de perspectives, nous allons procéder aux analyses nécessaires, afin d'étudier les adaptations mitochondriales, notamment au niveau de la biogenèse mitochondriale. Il s'agira de déterminer, si l'exercice en excentrique à 25cm/sec (environ 60% de la VO_2 max) est tout de même suffisant pour induire des adaptations métaboliques. A ce sujet, Nieman et al. (Nieman *et al.*, 2010) ont démontré chez l'homme une augmentation significative de l'expression de l'ARNm, sirtuin-1, du peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha (PGC1-a), de l'ADNm, de la cytochrome c oxidase et de la citrate

synthase, après plusieurs entraînements de 60min à 60% de VO₂max. Chez le rat, des entraînements de 60min à 75% de VO₂max, 5x/sem pendant plusieurs semaines à plusieurs mois, suffisent pour augmenter l'activité de la citrate synthase de manière significative (Suter *et al.*, 1995; Poole & Mathieu-Costello, 1996). Ceci laisse à penser qu'une intensité sous-maximale d'environ 60% de la VO₂max lors d'un exercice en descente et donc en mode de contraction « excentrique », suffirait pour induire des adaptations mitochondriales importantes. Nous pourrions à ce moment-là envisager d'obtenir à la fois des adaptations au niveau du phénotype métabolique (biogenèse mitochondriale) et du phénotype contractiles (typage musculaire, hypertrophie des fibres). Néanmoins, les résultats de notre étude démontrent qu'il faudrait à tout prix éviter une contrainte mécanique trop importante (vitesse de course trop élevée) lors de l'exercice en excentrique.

3. Les conséquences et les impacts délétères induits par l'entraînement excentrique

Les exercices excentriques ont été un certain temps décrits comme mal tolérés, provoquant de douleurs musculaires et de la fatigue, une ascension des CK et de la cortisolémie, plus importantes qu'avec des contractions concentriques. Par ailleurs, la lactodéshydrogénase (LDH) et les créatines kinases (CK) sont les marqueurs les plus sensibles de ces dommages musculaires. Une augmentation de l'activité de la LDH et des CK après un exercice de type excentrique est souvent observée (Nosaka & Clarkson, 1996).

En effet, selon Nosaka & Clarkson, le nombre de fibres endommagées serait proportionnel à la quantité de CK présente dans le muscle sollicité. Sous l'effet de lésions tissulaires induites par l'exercice excentrique, les leucocytes vont être mobilisés, activés et vont proliférer pendant et après l'exercice. En réaction aux dommages, les leucocytes vont libérer le facteur nécrosant des tumeurs (TNF α) afin de stimuler toute la phase de réaction aigue de la réponse inflammatoire. Pendant cette phase inflammatoire, qui dure une dizaine d'heures, une grande quantité de Ca²⁺ s'infiltré dans la lésion. Ce qui correspondrait à nos résultats obtenus lors de l'analyse de la cinétique de la production de RLO après le test triangulaire, avec un pic de production environ 6h après et un retour aux valeurs basales 24h après. Cependant, nous allons voir que ces "micro-lésions" induites par un exercice en excentrique ne sont pas automatiquement délétères. Mais qu'au contraire ce processus serait utile pour provoquer des adaptations au niveau du phénotype contractile, visant à augmenter

le niveau de force. En effet, la stimulation provenant de l'exercice excentrique amène les cellules satellites, ou myoblastes, à se diviser. Une partie des cellules reforme alors le stock des cellules satellites et une autre partie, en ajoutant ses noyaux à ceux de la fibre musculaire, permet la synthèse des protéines musculaires nécessaires à la croissance de la fibre. Finalement, les fibres musculaires soumises à un travail intensif excentrique, contiennent plus de mitochondries, forment un plus grand nombre de myofilament et de myofibrille, et emmagasinent plus de glycogène. Du coup, la quantité de tissu conjonctif entre les cellules augmente aussi. Ensemble, ces changements provoquent une augmentation notable du volume et de la force, et permet de limiter le déconditionnement musculaire.

Comme précédemment décrit, tout travail sollicitant grandement la fonction cardiovasculaire, chez les patients avec des affections cardio-respiratoires et vasculaires est clairement proscrite. Afin de prévenir une perte de la force musculaire et les multiples dysfonctions qui en découlent, un travail en excentrique semble alors tout à fait prometteur.

4. Intérêt de l'exercice excentrique dans le cadre des pathologies chroniques

Les patients atteints de pathologies cardiovasculaires se caractérisent, en général par une performance aérobie limitée due d'une part, aux phénomènes physiopathologiques de ces affections, et d'autre part, à l'inactivité physique conduisant à une intolérance à l'effort. Les conséquences sur la fonction musculaire périphériques ont été largement étudiées.

Le renforcement musculaire, depuis une quinzaine d'années, fait partie intégrante de la réadaptation cardiaque. En effet, la capacité à l'exercice d'un nombre important de patients atteints de pathologies chroniques, est souvent limitée au niveau central (cardiorespiratoire et cardiovasculaire), mais également au niveau périphérique (musculaire). Il apparaît qu'une amélioration du phénotype du muscle squelettique permet non seulement d'augmenter la force, mais également d'augmenter la capacité cardio-respiratoire des patients. Cela rend nécessaire une utilisation contrôlée du travail musculaire excentrique en thérapeutique et en prévention. Cependant, d'après les résultats de notre étude, les protocoles de renforcement musculaire excentrique doivent être réalisés avec une vitesse sous-maximale et une résistance progressives, d'où par exemple l'intérêt de l'utilisation de dynamomètres isocinétiques que l'on retrouve également dans les services avec qui nous travaillons au quotidien. La prévention de

la pathologie tendineuse passe par une quantification de l'activité musculaire excentrique réalisée lors de l'entraînement.

5. *La prévention des affections cardio-vasculaires*

Il est assez clair qu'une partie du budget de santé pourrait être économisée, si nous parvenions à améliorer l'état physique de patients atteints de pathologies chroniques. En effet, nous savons que les risques d'infarctus sont deux fois plus élevés chez les sujets sédentaires que chez les sujets entraînés. La sédentarité occupe une place importante, car tout organe a la capacité correspondante à son degré de sollicitation (Shimano *et al.*, 2006). Il est donc connu que la meilleure prévention des affections cardio-vasculaires et des nocifs de la sédentarité est l'entraînement d'endurance aérobie. Néanmoins, l'analyse des cas de décès survenus durant ou immédiatement après un effort physique en aérobie a montré que presque tous les sujets décédés dans ces conditions présentaient à la base une affection coronaire (Munschek, 1974 in Kraemer, 2006). Cette forme d'exercice est alors surtout à éviter pour les patients atteints d'une insuffisance cardiaque ou de maladies cardiorespiratoires, chez lesquels il faut privilégier un travail excentrique, sollicitant moins le système central et le système cardiorespiratoire et consommant moins d'oxygène.

L'objectif du laboratoire, au-delà du travail de cette thèse, est d'envisager un travail en excentrique, connu pour sa faible sollicitation du système cardiovasculaire, comme moyen d'amélioration de la qualité de vie chez des personnes atteintes de maladies cardiorespiratoires ainsi qu'auprès de personnes âgées à mobilité réduite, compte tenu de son faible coût bioénergétique. D'après nos résultats et après avoir fait le tour de la littérature, il est évident que l'entraînement en excentrique présente plus d'avantages que d'inconvénients. Malheureusement, encore trop souvent associé uniquement à des effets délétères tels que les lésions et les processus d'inflammations, ce type d'entraînement ne trouve pas encore sa place dans l'utilisation thérapeutique. Or, nous démontrons qu'en respectant quelques consignes, comme notamment le travail à des intensités sous-maximales, ainsi qu'une adaptation progressive des charges, l'exercice en excentrique ne présente aucun effet délétère sur la fonction mitochondriale, ainsi que la production du stress oxydant.

En ce qui concerne la recherche plus « fondamentale », une meilleure connaissance des voies de signalisation intracellulaire impliquée dans les mécanismes de contrôles de la biogenèse mitochondriale pourrait permettre l'élaboration de nouveaux traitements pharmacologiques afin de diminuer le handicap musculaire des patients.

La comparaison, au niveau moléculaire et cellulaire, des effets de l'entraînement en mode excentrique avec les effets de l'entraînement en mode concentrique permettrait de différencier les adaptations en fonction du type d'entraînement. Le mode excentrique engendre un stress mécanique associé à un stress métabolique modéré mais réel et inversement pour le mode concentrique. Cette démarche permettrait de bien différencier les facteurs de transcription majeurs (ou au contraire montrer les facteurs communs) dans chacune des grandes voies de signalisation.

Ces travaux devraient ainsi permettre la mise en place de protocoles d'entraînement en excentrique (descente) pouvant être réalisés chez ces patients atteints de pathologies cardio-respiratoires ; -vasculaires et métaboliques.

II. 2^{ème} étude: Le découplage mitochondrial diminue les capacités à l'exercice, malgré des adaptations métaboliques dans le muscle squelettique.

Dans le passé, notre laboratoire a démontré que suite à une augmentation de l'activité contractile, la mitochondrie était capable de s'adapter quantitativement mais aussi qualitativement (Zoll *et al.*, 2002, 2003). Dans une de nos études précédentes, nous avons reporté une densité mitochondriale normale dans le muscle squelettique des patients transplantés cardiaques, sans pour autant retrouver la corrélation classiquement observée avec la $VO_2\text{max}$ (Lampert *et al.*, 1996). Ce résultat suggérait que les mitochondries puissent être quantitativement normales mais fonctionnellement altérées, ce qui est compatible avec les observations très souvent retrouvées chez des patients atteints de pathologies cardio-respiratoires ; -vasculaires et métaboliques. Ainsi, dans notre deuxième partie de thèse, l'objectif était de démontrer le rôle majeur d'une dysfonction mitochondriale (par un découplage de la phosphorylation oxydative) sur les capacités maximales à l'exercice, la consommation maximale d' O_2 , ainsi que sur les adaptations mitochondriales (biogenèse

mitochondriale, fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire, capacités anti-oxydantes).

Une de nos observations clés a été la découverte d'une diminution de la capacité à l'exercice, malgré une augmentation de la consommation maximale d'oxygène ($VO_2\text{max}$) chez des rats traités avec un découplant mitochondrial. Ce qui nous amène à relancer une discussion sur les facteurs limitant la $VO_2\text{max}$ et la capacité à l'exercice. En effet, à ce jour un nombre important d'études démontre une forte corrélation entre la $VO_2\text{max}$ et la capacité à l'exercice et de façon plus large, une très forte corrélation entre la $VO_2\text{max}$ et le niveau de performance pour des distances allant du 800m au marathon (Costill *et al.*, 1973, Foster 1983). Au sein d'une grande population, $VO_2\text{max}$ est un critère discriminant de l'aptitude aérobie. Dans les épreuves de demi-fond, il est admis que plus un athlète a une $VO_2\text{max}$ élevée, plus il est performant. Néanmoins, nos résultats démontrent clairement que ce n'est pas forcément si simple. Cela pourrait être dû au fait que la $VO_2\text{max}$ n'est pas le seul facteur limitant. En effet, d'après une étude portant sur un groupe de coureurs de niveau très homogène, Conley & Krahenbuhl (Conley & Krahenbuhl, 1980) n'ont pas trouvé de rapports entre $VO_2\text{max}$ et la performance sur 10000 mètres. Par contre, dans ce même groupe, l'efficacité de la foulée (économie de course) était un excellent indice de la performance en course à pied. Avec ce même raisonnement, on peut citer l'exemple du coureur Dereck Clayton, qui avec une $VO_2\text{max}$ de 69,7ml/kg/min a réalisé 2h 08min au marathon alors que selon "la théorie extrapolée de $VO_2\text{max}$ ", il n'aurait pas dû être plus rapide que 2h 23min. A l'inverse, cette même théorie attribuait un temps inférieur à 2h 04min à l'infortuné Gary Tuttle ($VO_2\text{max}$ de 82,7ml/kg/min) qui au final finit son marathon en 2h 17min. Une $VO_2\text{max}$ élevée est donc une condition nécessaire mais insuffisante pour prétendre à un haut niveau de performance. Il est bien établi que la consommation d'oxygène varie considérablement entre les sujets pour une vitesse de course identique (Daniels *et al.*, 1978).

Par ailleurs, la conversion de l'énergie chimique (ATP), fournie par les métabolismes énergétiques, en énergie mécanique, produite par les fibres musculaires actives, n'est pas parfaite. En effet, une large partie de l'énergie métabolique produite se dissipe dans le tissu musculaire sous forme de chaleur, si bien que l'énergie mécanique générée (puissance mécanique externe) ne représente qu'une petite partie de l'énergie métabolique produite (puissance métabolique). L'efficacité de cette conversion chimico-mécanique d'énergie représente également un facteur important de la performance aérobie et peut être quantifiée chez l'athlète à travers les notions de rendement et de coût énergétique.

1. Le coût énergétique

Nos résultats ont démontré une diminution de l'économie de course dans le groupe traité par un découplant mitochondrial. En effet, pour une même vitesse de course, la consommation d'oxygène a été clairement plus élevée dans ce groupe par rapport au groupe contrôle. Le découplage mitochondrial semble ainsi altérer le coût énergétique des rats traités, entre autre facteur responsable de la diminution de la capacité à l'exercice, malgré une $VO_2\text{max}$ plus importante.

Transposé au domaine de la course à pied, le principe de conservation de l'énergie définit l'équivalence entre l'énergie totale dépensée par le coureur et l'énergie qui lui est fournie par les filières énergétiques. Lloyd, (1967) in (Camus *et al.*, 1985) parle de temps-record lorsque la durée de course est minimale et l'intensité aussi élevée que possible. Se référant au principe énoncé ci-dessus, nous saisissons l'importance du coût énergétique et du transport de la masse corporelle en tant que déterminant physiologique de la performance. Il suffit de rappeler que la musculature striée transforme une fraction de l'énergie totale qui lui est fournie par les filières énergétiques en travail mécanique avec une efficacité qui se mesure par le calcul du rendement, c'est-à-dire par le calcul du rapport entre le travail mécanique réalisé et l'énergie dépensée. Plus cette transformation est efficace, plus le rendement est élevé. Pour les coureurs dont le rendement est élevé et par conséquent, chez lesquels le coût énergétique est bas, cela signifie que l'utilisation d'un même potentiel énergétique permet de réaliser un travail mécanique plus important (donc de meilleures performances) que les sujets dont le rendement est inférieur.

Ainsi, le coût énergétique peut être défini comme le rapport entre le travail fourni divisé par l'énergie dépensée, c'est-à-dire vitesse/ VO_2 . Une augmentation de la vitesse pour une même consommation d'oxygène témoignerait d'une amélioration du "rendement" et du coût énergétique. La valeur du coût énergétique a été identifiée comme contribuant au succès de la course et semble ainsi présenter un des facteurs limitant de la capacité à l'exercice (Morgan *et al.*, 1989 In Chambers, 2005). Selon ces auteurs, un meilleur coût énergétique autorisait l'athlète à maintenir une vitesse de course plus soutenue et sur une longue durée. Selon Rieu *et al.* (1989 In Heugas, 1995), la performance en course à pied est étroitement dépendante de la capacité que possède l'individu à maintenir une vitesse maximale de déplacement. La dépense énergétique de l'athlète au cours de l'activité est reliée de façon

linéaire à sa vitesse de course. La pente de cette relation, qui varie en fonction des sujets, constituerait le coût énergétique.

2. *Les valeurs de VO₂max, véritable prédicteur de la performance ?*

Pour démontrer l'importance du coût énergétique sur la performance aérobie, je tenais à mettre en avant un exemple personnel. En tant que spécialiste de 800m, mes valeurs de VO₂max obtenues lors d'un test triangulaire maximal sur tapis roulant récemment, étaient d'environ 75ml/min/kg. Théoriquement, ces valeurs correspondent à une athlète de niveau mondial (environ 1'58"-2'00 sur 800m et environ 15'50" sur 5000m) et je pourrais clairement envisager une finale aux jeux olympiques. Or, mes records personnels cette année sur 800m sont de 2'12"21 et de 18'16 sur 5000m. J'ai ainsi pu me classer 4^{ème} aux championnats de France nationaux sur 800m. Nous sommes donc relativement loin des performances théoriques. Quand on analyse ma technique de course, ma foulée est encore loin d'être la plus performante. En effet, certains auteurs ont démontré qu'une variation de la longueur de la foulée pouvait améliorer le coût énergétique (Kaneko *et al.*, 1987). Selon eux, l'adaptation d'une fréquence plus grande ou plus faible augmenterait respectivement la part du travail interne et externe, et serait à l'origine des modifications musculaires et du surcoût énergétique enregistré. Les premiers travaux effectués par Hogberg (Hogberg, 1952a, 1952b) nous indiquent que lorsque l'athlète augmente sa foulée de 13,3 %, une augmentation de 11,9 % de VO₂ est également enregistrée. Tandis qu'une diminution de 12% de la longueur de foulée était associée à une augmentation de seulement 6% de VO₂. Or, mon amplitude de foulée (2m05) est clairement trop importante pour obtenir un coût énergétique plus favorable. Actuellement, un travail sur la fréquence et la vitesse gestuelle à la fois des membres supérieurs et inférieurs sur des plots, lattes, petites haies, a été mis en place pour améliorer ce facteur de performance.

Ainsi, le coût énergétique peut être amélioré à l'échelle de l'individu, en améliorant notamment la technique de course, mais ce paramètre peut également être sous l'influence de l'efficacité purement musculaire et dépendre du couplage des "usines à énergie" que sont les mitochondries comme nous avons pu le voir dans notre étude. Nous pouvons très bien imaginer qu'un athlète de demi-fond, de type 800m-1500m possède des mitochondries avec un couplage optimum, permettant de produire un maximum d'ATP avec une consommation

d'oxygène minimum. Cela demande des adaptations qui peuvent avoir lieu au niveau des enzymes des complexes de la chaîne respiratoire, de l'assemblage des complexes de cette chaîne, des capacités antioxydantes, mais également au niveau de la composition des membranes mitochondriales, notamment en acides gras qui la composent et qui pourrait améliorer le couplage entre les oxydations et les phosphorylations. Pour le vérifier il faudrait pouvoir effectuer des biopsies de muscles impliqués dans ce type de courses, ce qui représente un autre problème, puisque généralement ce sont des biopsies du muscle vaste externe qui sont réalisées, qui ne représente pas les principaux muscles utilisés sur ce type de course. Il faudrait pouvoir effectuer des biopsies dans les muscles du mollet, puisque ce sont les muscles les plus largement recrutés chez les athlètes les plus performants sur ces distances.

D'autres facteurs, peuvent avoir un impact sur la performance en endurance. En effet, les rats traités par un découplant ont présenté une lactatémie significativement plus importante en fin d'exercice. Ainsi, nous pouvons supposer qu'une altération de la phosphorylation oxydative entraîne une production de lactate plus importante et que cette dernière serait également responsable de la diminution de la performance maximale.

Nombreux sont les auteurs qui ont montré que la lactatémie apparaît comme un facteur déterminant de la performance en course à pied (Skinner & Mc Lellan, 1980, Sjödén & Jacobs 1981, Brooks 1985, Davis 1985 in Billat, 2003). Pour certains d'entre eux, en course à pied, il serait un indicateur de la performance plus fiable que la consommation d'oxygène (Miller & Manfredi, 1987 in Sewall & Fernhall, 1995), la composition en fibres musculaires et l'économie de course. Sur un effort bref, la contraction musculaire survient dans une première phase en absence d'oxygène et aboutit ensuite à la formation d'acide lactique. Il est reconnu qu'en présence d'oxygène, l'acide lactique formé est éliminé. A partir de ce constat, Douglas (1927) a montré que l'acide lactique ne pouvait pas être éliminé, si l'apport d'oxygène ne se faisait pas convenablement dans la deuxième phase. Il s'accumule alors dans le sang et contraint rapidement à l'arrêt de l'exercice (Rieu, 1986). Douglas (1927) explique l'accumulation d'acide lactique dans le sang comme étant la résultante d'un déficit en oxygène au niveau de la cellule musculaire.

Si notre étude a démontré une respiration mitochondriale maximale plus élevée chez les rats traités avec un découplant associé à une $VO_2\text{max}$ plus importante, l'ACR, paramètre qualitatif mitochondrial, était clairement diminué, mettant en évidence un découplage de la

phosphorylation oxydative. Ainsi, la forte disponibilité de l'oxygène permet aux mitochondries musculaires du groupe traité de consommer l'oxygène de façon très importante, d'où l'augmentation de la $VO_2\text{max}$, mais de manière inefficace dû faite de la fuite de protons. Ainsi, la production d'ATP s'avère insuffisante d'où l'augmentation de métabolisme anaérobie qui essaye de compenser ce manque, ce qui a tendance à augmenter la production de lactate pour des vitesses de courses moins élevées.

Les résultats présentés dans ce travail montrent donc qu'un découplage mitochondrial entraîne des changements "qualitatifs" du métabolisme du muscle squelettique, ce qui a directement des répercussions à la fois sur la capacité à l'exercice, la $VO_2\text{max}$ et provoque la mise en place d'adaptations "quantitatives" au niveau de la fonction mitochondriale. En effet, ce découplage permet l'augmentation de la quantité de mitochondries grâce à une activation des voies de signalisation impliquées dans la biogenèse mitochondriale.

Dans tous les cas, cette étude nous montre l'importance du métabolisme musculaire, et donc de la part périphérique, dans les performances maximales lors d'une épreuve d'effort. Il est clair que la $VO_2\text{max}$ n'est pas à elle seule un bon reflet des performances en endurance. L'efficacité musculaire et la technique de course peuvent faire varier de façon considérable le cout énergétique, et donc l'économie de course qui participe de façon essentielle à la performance, notamment chez les athlètes en endurance de très haut niveau.

Concernant les adaptations métaboliques musculaires suite au traitement à l'aide d'un découplant, nous avons pu mettre en évidence une stimulation des voies de contrôle de la biogenèse mitochondriale. Ceci pourrait ouvrir de nouvelles voies d'applications thérapeutiques. En effet, nos résultats mettent clairement en évidence une augmentation de la masse mitochondriale (biogenèse mitochondriale, NADH et Succinate dehydrogenase) en réponse à une altération qualitative (découplage de la phosphorylation oxydative et diminution de la production d'ATP), permettant à la mitochondrie de compenser, au moins partiellement, un dysfonctionnement qualitatif par une amélioration quantitative. Dans un futur, il serait alors tout à fait envisageable de remplacer le découplant "2,4-Dinitrophenol", hautement toxique, par un découplant plus modéré, par exemple à base de plantes, afin d'obtenir un stress modéré permettant la mise en place d'une augmentation de la masse mitochondriale sans pour autant avoir les effets délétères du DNP. Dans les parties précédentes, nous avons largement discuté les effets bénéfiques d'une amélioration de la biogenèse mitochondriale (augmentation des enzymes antioxydants avec diminution du stress

oxydant etc.). En perspectives et en concordance avec d'autres auteurs, nous pourrions envisager l'utilisation du découplage mitochondrial transitoire afin de limiter l'augmentation de la production de RLO (Stier *et al.*, 2014) (effet aigu). Ce découplage étant transitoire, nous pourrions également utiliser ses effets chroniques sur la masse mitochondriale, en posant l'hypothèse que ce traitement pourrait améliorer le métabolisme musculaire permettant de diminuer les atteintes de la fonction mitochondriale du muscle squelettique dans différents types de pathologies chroniques telle que le diabète de type 2, l'obésité et les maladies cardiovasculaires. Il est pour cela important de trouver des molécules découplantes ayant des effets délétères moindres, notamment en termes d'hyperthermie, très dangereuse pour la santé.

Ainsi nous pourrions imaginer une étude proche de ce que nous avons pu faire concernant l'I-R, en remplaçant l'exercice (comme mode de préconditionnement) par un traitement avec un découplant une heure avant le protocole d'ischémie-reperfusion (IR) afin de protéger la fonction mitochondriale du muscle squelettique.

Nous pourrions poser l'hypothèse que les effets de la molécule découplante pourraient diminuer les effets délétères de l'I-R en diminuant le stress oxydant musculaire (cf. 3^{ème} étude).

III. 3^{ème} étude: L'effet protecteur d'un exercice aigu avant une période d'ischémie-reperfusion sur la fonction mitochondriale du muscle squelettique.

L'objectif de cette étude était de mettre en place un nouveau modèle de préconditionnement et de montrer l'effet protecteur d'un exercice de 30min sur le muscle squelettique via une "pré-activation" mitochondriale (effet hormétique). En effet, si les effets de l'entraînement chronique sont bien connus au niveau métabolique, les effets aigus d'un exercice physique semblent moins évidents.

Seules quelques rares études se sont intéressées aux effets aigus d'un exercice physique unique sur la fonction mitochondriale. Ces auteurs ont pu constater une induction du stress métabolique (épuisement des stocks d'ATP, la déplétion en glycogène, augmentation du stress oxydant modéré) après un exercice, caractéristique, en partie, d'un effet hormétique. Tonkonogi et al, montrent qu'un exercice aigu intense augmente la respiration mitochondriale chez l'homme (Tonkonogi *et al.*, 1999). Nous avons trouvé le même résultat dans une étude

chez le rat où nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la respiration mitochondriale après un exercice exhaustif (Bouitbir *et al.*, 2011b). Hugh et al. ont constaté une augmentation significative de l'irisin, impliqué dans le métabolisme énergétique après un exercice aigu (Huh *et al.*, 2014). Par ailleurs, Pilegaard et al., mettent en évidence une augmentation du Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) ainsi que de l'activité citrate synthase après un exercice aigu intense (Pilegaard *et al.*, 2003). Au niveau cardiaque, certains auteurs ont observé une augmentation de l'activité de MnSOD via certaines cytokines (IL-6 et TNF-alpha) (Yamashita *et al.*, 1999), une activation du canal mito-K(ATP) (Quindry *et al.*, 2012), l'activation des "heat shock proteins" (HSP72), ainsi qu'une augmentation du stress oxydant, modifiant certaines protéines et stimulant l'activité des enzymes antioxydants. Ainsi, il semble bien que l'exercice active la fonction mitochondriale qui voit sa vitesse de respiration maximale augmentée. Les mécanismes restent encore inconnus, mais on peut émettre l'hypothèse que l'augmentation de calcium intra mitochondriale pourrait participer à ces effets via une activation de certaines enzymes comme la NADH oxydase qui est sensible aux variations calciques. On peut également penser que les changements du potentiel redox (via une augmentation de la production de RLO) qui se produit pendant l'exercice, peut changer la conformation de certaines enzymes (par ex. création d'un pont disulfure), ce qui pourrait globalement changer l'efficacité des complexes de la chaîne respiratoire, permettant une augmentation des capacités à produire de l'ATP et à consommer de l'oxygène. Néanmoins ces hypothèses mériteraient d'être confirmées ou infirmées à l'aide de nouveaux projets expérimentaux.

Il est actuellement admis que l'ischémie pure provoque une altération importante de la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale des muscles squelettique chez le rat comme il a été démontré dans les travaux de Brandão *et al.* (Brandão *et al.*, 2003) et de Thaveau *et al.* (Thaveau *et al.*, 2007). Cependant, différents types de conditionnements ischémiques ont été décrits, selon le moment où le conditionnement ischémique est pratiqué par rapport à l'évènement ischémique (pré, per, ou postconditionnement). Chaque type de conditionnement ischémique possède un mode d'action sensiblement différent de l'autre, avec plusieurs voies de signalisation communes. La technique de préconditionnement ischémique a été décrite pour la première fois par Murry *et al.* en 1986 sur un modèle canin d'ischémie du myocarde (Murry *et al.*, 1986). Depuis ce jour, plusieurs stratégies ont été mises au point pour lutter contre les dommages du muscle squelettique, induits par l'IR. Au niveau de la mitochondrie,

le préconditionnement ischémique a pu réduire les atteintes des complexes I et II (Thaveau *et al.*, 2007; Mansour *et al.*, 2012). Le préconditionnement semble notamment diminuer la production des RLO (Papanastasiou *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2002). Enfin, chez l'homme, les patients "préconditionnés" par clampage et déclampage de l'artère pulmonaire avant pneumectomie, présentaient des taux plus élevés de SOD en post-opératoire par rapport au groupe contrôle (Chen *et al.*, 1999).

Concernant notre étude qui montre l'effet protecteur d'un préconditionnement par l'exercice, nous avons pu mettre en évidence une protection de la fonction mitochondriale du muscle gastrocnémien ischémique chez les souris ayant effectuées un exercice aigu 30min avant la période d'IR. D'autre part, l'IR a augmenté le stress oxydant (*via* la production d'H₂O₂) dans la patte ischémique, ce qui n'était pas le cas dans le groupe de souris ayant effectué l'exercice de 30min avant l'IR. Par ailleurs, les résultats de l'histologie ont clairement montré une activation métabolique sur les coupes du muscle gastrocnémien dans le groupe ayant effectué un exercice avant l'IR. L'exercice aigu semble ainsi suffisant pour protéger le muscle squelettique des effets délétères d'une IR via une "pré-activation" métabolique. La diminution de la production de RLO après I-R suggère un effet hormétique "aigu" du préconditionnement par l'exercice. En effet on peut penser que l'exercice a augmenté la production de RLO de façon modérée, activant les défenses antioxydantes, notamment les défenses enzymatiques. Suite à cela, il semble que durant l'I-R la production de RLO fut grandement réduite, ce qui a favorisé la diminution des effets délétères, notamment au niveau de la fonction mitochondriale (préservation de la vitesse maximale de respiration mitochondriale).

Notre étude montre donc qu'il est envisageable d'utiliser un exercice sous-maximal comme moyen de préconditionnement du muscle à côté du préconditionnement par ischémie. Il serait à présent intéressant de comparer ces modes de préconditionnement en fonction du type d'ischémie et du temps d'ischémie afin de peut-être mettre en évidence que tel ou tel protocole de préconditionnement est plus efficace en fonction de l'organe en ischémie ou du temps total d'ischémie.

1. Préconditionnement de l'IR par un découplage modéré

Récemment, un travail Duteil et al., (Duteil *et al.*, 2010) auquel l'équipe a participé, a montré qu'un découplage mitochondrial partiel protégeait les souris knock-out TIF2 (i)skm-/- contre le diabète de type 2 et de l'obésité induits par la sédentarité. Ce modèle de souris transgénique, knock-out pour la protéine TIF2 (transcriptional mediators/intermediary factor 2, corégulateur transcriptionnel jouant un rôle dans l'acétylation et la méthylation des histones dans la transcription), s'accompagne d'une augmentation du transcrit d'une protéine découplante 3 (uncoupling proteins, UCP3) présente majoritairement au niveau du muscle squelettique. Cette UCP permet la rentrée des protons, sans production d'ATP par une autre voie que celle de l'ATP synthase, abaissant ainsi le potentiel de membrane. Ce découplage modéré, diminue la production de RLO à l'état basal et protégerait la mitochondrie contre les dommages de la peroxydation lipidique par facilitation de l'export des acides gras (Starkov, 1997; Korshunov *et al.*, 1997). Cette UCP est activable par les RLO suggérant qu'elle joue un rôle de défense contre le stress oxydant.

Selon Korshunov et al., un découplage modéré peut être suffisant pour diminuer la production de RLO et qu'une diminution de 10% du potentiel de membrane entraîne une diminution de 75% de la production mitochondriale de RLO. Dans la mesure où le stress oxydant participe largement aux effets délétères de l'ischémie-reperfusion (dysfonction mitochondriale, ouverture précoce du mPTP), nous pourrions supposer qu'un découplage modéré via un découplant non toxique, par exemple à base de plantes, protège contre l'IR via une moindre production de RLO. Il serait intéressant de montrer que ces souris TIF2 (i)skm-/- sont protégées des effets délétères de l'I-R grâce à cette augmentation du découplage mitochondriale.

Si la littérature montre une diminution de la production de RLO après un découplage, les résultats de notre deuxième étude (effet du DNP) mettent également en évidence une activation des enzymes antioxydants ainsi qu'une augmentation de la masse mitochondriale (biogenèse mitochondriale, NADH et Succinate dehydrogenase). La mitochondrie dispose alors d'un meilleur système de défense antioxydant et pourrait ainsi répondre plus favorablement au stress induit par l'IR. Ainsi, chez des patients dans l'impossibilité de réaliser ne serait-ce qu'un test de marche, un traitement avec un découplant modéré (sans hyperthermie importante), à la manière d'un préconditionnement, pendant la période précédent d'une IR pourrait améliorer leurs défenses antioxydantes et protéger des effets délétères importantes.

2. Préconditionnement par un exercice en excentrique?

Pour faire un lien potentiel avec notre première étude, nous pouvons imaginer la mise en place de différents protocoles d'exercice en preconditionnement, en fonction du type de pathologie dont les patients sont affectés et notamment l'utilisation de l'exercice en descente (mode excentrique).

Comme précédemment décrit, tout travail sollicitant grandement la fonction cardio-vasculaire, chez les patients avec des affections cardio-respiratoires et vasculaires est souvent proscrite. Nous avons démontré que la consommation d'oxygène diminuait significativement pour un travail excentrique à même niveau de puissance mécanique qu'un exercice en concentrique. Ainsi, pour des patients incapables de solliciter de façon importante leur système cardio-vasculaire, nous pouvons imaginer la réalisation d'un exercice sous-maximal en excentrique afin de preconditionner le muscle qui sera soumis à une ischémie lors d'une opération chirurgicale programmée. Ce genre de protocole pourrait être déjà envisagé chez l'animal dans un premier temps.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ces trois années de thèse, et notamment à travers nos trois principales études, nous avons pu explorer plusieurs mécanismes physiologiques permettant de mieux comprendre les capacités d'adaptation de la fonction mitochondriale du muscle squelettique. Nous avons notamment montré que différents types de stress métaboliques, qui déclenchent le phénomène d'hormèse mitochondriale, permettaient d'améliorer et/ou de protéger le potentiel métabolique cellulaire.

Il semble qu'en effet, un véritable dialogue bilatéral entre la cellule et la mitochondrie dicte à la fois les adaptations/activations cellulaires et mitochondriales. Ainsi, au niveau mécanistique, nos résultats montrent que l'aspect "qualitatif" du fonctionnement de la mitochondrie, à côté de l'importance quantitative (densité mitochondriale), est un déterminant majeur du métabolisme énergétique du muscle squelettique. Que ce soit le couplage entre les oxydations et les phosphorylations, ou la production modérée de radicaux libres, ces paramètres semblent non seulement gouverner la mise en place d'adaptations chroniques permettant d'optimiser les grandes voies métaboliques intracellulaires (activation de la biogenèse mitochondriale), mais permet également une activation quasi immédiate de protéines jouant un rôle majeur dans les défenses contre les agressions liées à l'augmentation trop importante de la production de RLO.

Concernant la physiologie de l'exercice, nos travaux nous rappellent que ce qui dicte l'ensemble des adaptations à l'exercice, c'est la demande du muscle squelettique à la fois en nutriments mais surtout en oxygène. L'accepteur final de l'oxygène étant la mitochondrie, c'est bien elle qui dicte à l'ensemble de l'organisme ses besoins. L'organisme, quant à lui, met tout en œuvre pour que ces besoins soient assouvis et optimisés. Ainsi, lorsque cette mitochondrie dysfonctionne, c'est l'ensemble de l'organisme qui doit réagir, et trouver des solutions/adaptations adéquates. C'est pour cela que la mitochondrie est bien le premier facteur qui participe non seulement à la limitation des paramètres maximaux à l'exercice, mais également à la limitation de la consommation maximale en oxygène. **L'optimisation de la fonction mitochondriale des tissus, c'est la garantie d'une amélioration à la fois des capacités d'endurance mais également des capacités de lutte contre quasi l'ensemble des stress auxquels l'organisme est soumis en (quasi) permanence.**



Finale Championats de France Nationaux 800m en 2014

"Tout ce qui n'apoptose pas (la mitochondrie), rend plus fort (l'organisme)".

BIBLIOGRAPHIE

- Adolfsson J, Ljungqvist A, Tornling G & Unge G (1981). Capillary increase in the skeletal muscle of trained young and adult rats. *J Physiol* 310, 529–532.
- Aggeler R & Capaldi RA (1990). Yeast cytochrome c oxidase subunit VII is essential for assembly of an active enzyme. Cloning, sequencing, and characterization of the nuclear-encoded gene. *J Biol Chem* 265, 16389–16393.
- Andersen NB, Andreassen TT, Orskov H & Oxlund H (2000). Growth hormone and mild exercise in combination increases markedly muscle mass and tetanic tension in old rats. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc* 143, 409–418.
- Anflous K, Blondel O, Bernard A, Khrestchatisky M & Ventura-Clapier R (1998). Characterization of rat porin isoforms: cloning of a cardiac type-3 variant encoding an additional methionine at its putative N-terminal region. *Biochim Biophys Acta* 1399, 47–50.
- Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Gubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S & Ricquier D (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 26, 435–439.
- Asmussen E (1953). Positive and negative muscular work. *Acta Physiol Scand* 28, 364–382.
- Astrand PO, Cuddy TE, Saltin B & Stenberg J (1964). CARDIAC OUTPUT DURING SUBMAXIMAL AND MAXIMAL WORK. *J Appl Physiol* 19, 268–274.
- Azenabor AA & Hoffman-Goetz L (1999). Intrathymic and intrasplenic oxidative stress mediates thymocyte and splenocyte damage in acutely exercised mice. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1999, 86, 1823–1827.
- Badesch DB, McLaughlin VV, Delcroix M, Vizza CD, Olschewski H, Sitbon O & Barst RJ (2004). Prostanoid therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43, 56S–61S.
- Balaban RS (1990). Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am J Physiol* 258, C377–389.
- Balaban RS, Nemoto S & Finkel T (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483–495.
- Bassett DR Jr & Howley ET (2000). Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med Sci Sports Exerc* 32, 70–84.
- Beckman KB & Ames BN (1998). Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci* 854, 118–127.
- Birot OJG, Koulmann N, Peinnequin A & Bigard XA (2003). Exercise-induced expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat skeletal muscle is dependent on fibre type. *J Physiol* 552, 213–221.
- Bjelakovic G, Nikolova D, Glud LL, Simonetti RG & Glud C (2012). Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst Rev* 3, CD007176.
- Blanc J, Alves-Guerra MC, Esposito B, Rousset S, Gourdy P, Ricquier D, Tedgui A, Miroux B & Mallat Z (2003). Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis. *Circulation* 107, 388–390.
- Bobyleva V, Bellei M, Kneer N & Lardy H (1997). The effects of the ergosteroid 7-oxo-dehydroepiandrosterone on mitochondrial membrane potential: possible relationship to thermogenesis. *Arch Biochem Biophys* 341, 122–128.
- Boehm E, Ventura-Clapier R, Mateo P, Lechène P & Veksler V (2000). Glycolysis supports calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in skinned ventricular fibres of mice deficient in mitochondrial and cytosolic creatine kinase. *J Mol Cell Cardiol* 32, 891–902.

- Bonen A, Dyck DJ & Luiken JJ (1998). Skeletal muscle fatty acid transport and transporters. *Adv Exp Med Biol* 441, 193–205.
- Booth FW & Thomason DB (1991). Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev* 71, 541–585.
- Boutbir J, Charles A-L, Rasseneur L, Dufour S, Piquard F, Geny B & Zoll J (2011a). Atorvastatin treatment reduces exercise capacities in rats: involvement of mitochondrial impairments and oxidative stress. *J Appl Physiol* 111, 1477–1483.
- Boutbir J, Charles A-L, Rasseneur L, Dufour S, Piquard F, Geny B & Zoll J (2011b). Atorvastatin treatment reduces exercise capacities in rats: involvement of mitochondrial impairments and oxidative stress. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* 111, 1477–1483.
- Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsøe R & Dela F (2007). Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 50, 790–796.
- Boveris A & Chance B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707–716.
- Boveris A, Oshino N & Chance B (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617–630.
- Brand MD (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol* 35, 811–820.
- Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS & Cornwall EJ (2005). The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J* 392, 353–362.
- Brandão ML, Roselino JES, Piccinato CE & Cherri J (2003). Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J Surg Res* 110, 235–240.
- Brooke MH & Kaiser KK (1970). Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 23, 369–379.
- Camus G, Thys H, Lhermerout C & Deroanne D (1985). [Relation between maximal oxygen consumption and the record time in the 1500-meter run. Analysis of Lloyd's model]. *J Physiol (Paris)* 80, 3–7.
- Casillas JM, Gremeaux V, Damak S, Feki A & Pérennou D (2007). Exercise training for patients with cardiovascular disease. *Ann Réadapt Médecine Phys Rev Sci Société Fr Rééduc Fonct Réadapt Médecine Phys* 50, 403–418, 386–402.
- Cerra FB, Lajos TZ, Montes M & Siegel JH (1975). Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery* 78, 95–104.
- Chance B (1965). Reaction of oxygen with the respiratory chain in cells and tissues. *J Gen Physiol* 49, Suppl:163–195.
- Charifi N, Kadi F, Féasson L, Costes F, Geysant A & Denis C (2004). Enhancement of microvessel tortuosity in the vastus lateralis muscle of old men in response to endurance training. *J Physiol* 554, 559–569.
- Charles A-L, Guilbert A-S, Boutbir J, Goette-Di Marco P, Enache I, Zoll J, Piquard F & Geny B (2011). Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg* 98, 511–516.
- Clifford PS & Hellsten Y (2004). Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* 97, 393–403.
- Close GL, Ashton T, Cable T, Doran D & MacLaren DPM (2004). Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species. *Eur J Appl Physiol* 91, 615–621.

- Conley DL & Krahenbuhl GS (1980). Running economy and distance running performance of highly trained athletes. *Med Sci Sports Exerc* 12, 357–360.
- Cour M, Gomez L, Mewton N, Ovize M & Argaud L (2011). Postconditioning: from the bench to bedside. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 16, 117–130.
- Daniels J, Oldridge N, Nagle F & White B (1978). Differences and changes in VO₂ among young runners 10 to 18 years of age. *Med Sci Sports* 10, 200–203.
- Davies CT & Barnes C (1972). Negative (eccentric) work. II. Physiological responses to walking uphill and downhill on a motor-driven treadmill. *Ergonomics* 15, 121–131.
- Davies KJ, Packer L & Brooks GA (1981). Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. *Arch Biochem Biophys* 209, 539–554.
- Degens H, Turek Z, Hoofd LJ, Van't Hof MA & Binkhorst RA (1992). The relationship between capillarisation and fibre types during compensatory hypertrophy of the plantaris muscle in the rat. *J Anat* 180 (Pt 3), 455–463.
- Dempsey JA, Hanson PG & Henderson KS (1984). Exercise-induced arterial hypoxaemia in healthy human subjects at sea level. *J Physiol* 355, 161–175.
- Domenech RJ (2006). Preconditioning A New Concept About the Benefit of Exercise. *Circulation* 113, e1–e3.
- Duchen MR (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 25, 365–451.
- Dudley GA, Tullson PC & Terjung RL (1987). Influence of mitochondrial content on the sensitivity of respiratory control. *J Biol Chem* 262, 9109–9114.
- Dufour SP, Doutreleau S, Lonsdorfer-Wolf E, Lampert E, Hirth C, Piquard F, Lonsdorfer J, Geny B, Mettauer B & Richard R (2007). Deciphering the metabolic and mechanical contributions to the exercise-induced circulatory response: insights from eccentric cycling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R1641–1648.
- Dufour SP, Lampert E, Doutreleau S, Lonsdorfer-Wolf E, Billat VL, Piquard F & Richard R (2004). Eccentric cycle exercise: training application of specific circulatory adjustments. *Med Sci Sports Exerc* 36, 1900–1906.
- Durand RJ, Kraemer RR, Hollander DB, Tryniecki JL, Wall M, Saxon L & Hebert EP (2003). Different effects of concentric and eccentric muscle actions on plasma volume. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* 17, 541–548.
- Duteil D, Chambon C, Ali F, Malivindi R, Zoll J, Kato S, Geny B, Chambon P & Metzger D (2010). The transcriptional coregulators TIF2 and SRC-1 regulate energy homeostasis by modulating mitochondrial respiration in skeletal muscles. *Cell Metab* 12, 496–508.
- Dyck DJ, Peters SJ, Glatz J, Gorski J, Keizer H, Kiens B, Liu S, Richter EA, Spriet LL, van der Vusse GJ & Bonen A (1997). Functional differences in lipid metabolism in resting skeletal muscle of various fiber types. *Am J Physiol* 272, E340–351.
- Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC & Brand MD (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96–99.
- Fernández L, Heredia N, Grande L, Gómez G, Rimola A, Marco A, Gelpí E, Roselló-Catafau J & Peralta C (2002). Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology* 36, 562–572.
- Fitts RH, Booth FW, Winder WW & Holloszy JO (1975). Skeletal muscle respiratory capacity, endurance, and glycogen utilization. *Am J Physiol* 228, 1029–1033.
- Flück M (2004). Exercise-modulated mitochondrial phenotype; sensors and gene regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 25, 235–237.

- Flück M & Hoppeler H (2003). Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146, 159–216.
- Folkman J & Shing Y (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem* 267, 10931–10934.
- Formigli L, Lombardo LD, Adembri C, Brunelleschi S, Ferrari E & Novelli GP (1992). Neutrophils as mediators of human skeletal muscle ischemia-reperfusion syndrome. *Hum Pathol* 23, 627–634.
- Galiè N, Negro L & Simonneau G (2009). The use of combination therapy in pulmonary arterial hypertension: new developments. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc* 18, 148–153.
- Garlid KD, Jabůrek M & Jezek P (1998). The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett* 438, 10–14.
- Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G & Lenaz G (2001). 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.
- Gibala MJ, Interisano SA, Tarnopolsky MA, Roy BD, MacDonald JR, Yarasheski KE & MacDougall JD (2000). Myofibrillar disruption following acute concentric and eccentric resistance exercise in strength-trained men. *Can J Physiol Pharmacol* 78, 656–661.
- Gledhill N (1982). Blood doping and related issues: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 14, 183–189.
- Goll DE, Neti G, Mares SW & Thompson VF (2008). Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci* 86, E19–35.
- Gomez-Cabrera M-C, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J & Viña J (2008). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr* 87, 142–149.
- Gonzalez NC, Kirkton SD, Howlett RA, Britton SL, Koch LG, Wagner HE & Wagner PD (2006). Continued divergence in VO₂max of rats artificially selected for running endurance is mediated by greater convective blood O₂ delivery. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 101, 1288–1296.
- Gordon AM, Homsher E & Regnier M (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 80, 853–924.
- Grisotto PC, dos Santos AC, Coutinho-Netto J, Cherri J & Piccinato CE (2000). Indicators of Oxidative Injury and Alterations of the Cell Membrane in the Skeletal Muscle of Rats Submitted to Ischemia and Reperfusion. *J Surg Res* 92, 1–6.
- Guillot M, Charles A-L, Chamaroux-Tran TN, Bouitbir J, Meyer A, Zoll J, Schneider F & Geny B (2013). Oxidative stress precedes skeletal muscle mitochondrial dysfunction during experimental aortic cross-clamping but is not associated with early lung, heart, brain, liver, or kidney mitochondrial impairment. *J Vasc Surg*; DOI: 10.1016/j.jvs.2013.07.100.
- Van Hall G (2000). Lactate as a fuel for mitochondrial respiration. *Acta Physiol Scand* 168, 643–656.
- Han D, Canali R, Rettori D & Kaplowitz N (2003). Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Mol Pharmacol* 64, 1136–1144.
- Handberg A, Megeney LA, McCullagh KJ, Kayser L, Han XX & Bonen A (1996). Reciprocal GLUT-1 and GLUT-4 expression and glucose transport in denervated muscles. *Am J Physiol* 271, E50–57.

- Handoko ML, Lamberts RR, Redout EM, de Man FS, Boer C, Simonides WS, Paulus WJ, Westerhof N, Allaart CP & Vonk-Noordegraaf A (2009a). Right ventricular pacing improves right heart function in experimental pulmonary arterial hypertension: a study in the isolated heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1752–1759.
- Handoko ML, de Man FS, Happé CM, Schaliij I, Musters RJP, Westerhof N, Postmus PE, Paulus WJ, van der Laarse WJ & Vonk-Noordegraaf A (2009b). Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. *Circulation* 120, 42–49.
- Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, Yan Z & Spiegelman BM (2007). Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem* 282, 30014–30021.
- Hansford RG, Hogue BA & Mildaziene V (1997). Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr* 29, 89–95.
- Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300.
- Harper JA, Dickinson K & Brand MD (2001). Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes* 2, 255–265.
- Von Harsdorf R, Li PF & Dietz R (1999). Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 99, 2934–2941.
- Herrero A & Barja G (2000). Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 32, 609–615.
- Hogberg P (1952a). Length of stride, stride frequency, “flight” period and maximum distance between the feet during running with different speeds. *Arbeitsphysiologie Int Z Für Angew Physiol* 14, 431–436.
- Hogberg P (1952b). How do stride length and stride frequency influence the energy-output during running? *Arbeitsphysiologie Int Z Für Angew Physiol* 14, 437–441.
- Holloszy JO & Coyle EF (1984). Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* 56, 831–838.
- Hoppeler H (1986). Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 7, 187–204.
- Hoppeler H & Flück M (2002). Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity. *J Exp Biol* 205, 2143–2152.
- Howald H, Hoppeler H, Claassen H, Mathieu O & Straub R (1985). Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflüg Arch Eur J Physiol* 403, 369–376.
- Huang WC, Chen PC, Jou SB & Cheng JT (2001). Protein kinase C and changes in manganese superoxide dismutase gene expression in cultured glial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28, 822–825.
- Huh JY, Mougios V, Skraparlis A, Kabasakalis A & Mantzoros CS (2014). Irisin in response to acute and chronic whole-body vibration exercise in humans. *Metabolism* 63, 918–921.
- Irrcher I, Adhietty PJ, Sheehan T, Joseph A-M & Hood DA (2003). PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C1669–1677.

- Isner-Horobeti M-E, Dufour SP, Vautravers P, Geny B, Coudeyre E & Richard R (2013). Eccentric exercise training: modalities, applications and perspectives. *Sports Med Auckl NZ* 43, 483–512.
- Jackman MR & Willis WT (1996). Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *Am J Physiol* 270, C673–678.
- Jennings RB & Reimer KA (1983). Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation* 68, 125–36.
- Jeukendrup AE, Saris WH & Wagenmakers AJ (1998a). Fat metabolism during exercise: a review. Part I: fatty acid mobilization and muscle metabolism. *Int J Sports Med* 19, 231–244.
- Jeukendrup AE, Saris WH & Wagenmakers AJ (1998b). Fat metabolism during exercise: a review--part II: regulation of metabolism and the effects of training. *Int J Sports Med* 19, 293–302.
- Ji LL, Dillon D & Wu E (1991). Myocardial aging: antioxidant enzyme systems and related biochemical properties. *Am J Physiol* 261, R386–392.
- Jöbsis FF & Stainsby WN (1968). Oxidation of NADH during contractions of circulated mammalian skeletal muscle. *Respir Physiol* 4, 292–300.
- Jóhannsson E, Waerhaug O & Bonen A (1996). Effect of cross-reinnervation on the expression of GLUT-4 and GLUT-1 in slow and fast rat muscles. *Am J Physiol* 270, R1355–1360.
- Kadenbach B (2003). Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1604, 77–94.
- Kadenbach B, Barth J, Akgün R, Freund R, Linder D & Possekkel S (1995). Regulation of mitochondrial energy generation in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1271, 103–109.
- Kanter M (1995). Free radicals and exercise: effects of nutritional antioxidant supplementation. *Exerc Sport Sci Rev* 23, 375–397.
- Kay L, Daneshrad Z, Saks VA & Rossi A (1997). Alteration in the control of mitochondrial respiration by outer mitochondrial membrane and creatine during heart preservation. *Cardiovasc Res* 34, 547–556.
- Khalil AA, Aziz FA & Hall JC (2006). Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 117, 1024–1033.
- Kirby DM, McFarland R, Ohtake A, Dunning C, Ryan MT, Wilson C, Ketteridge D, Turnbull DM, Thorburn DR & Taylor RW (2004). Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *J Med Genet* 41, 784–789.
- Knuttgen HG, Patton JF & Vogel JA (1982). An ergometer for concentric and eccentric muscular exercise. *J Appl Physiol* 53, 784–788.
- Koretsky AP & Balaban RS (1987). Changes in pyridine nucleotide levels alter oxygen consumption and extra-mitochondrial phosphates in isolated mitochondria: a ³¹P-NMR and NAD(P)H fluorescence study. *Biochim Biophys Acta* 893, 398–408.
- Korshunov SS, Skulachev VP & Starkov AA (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416, 15–18.
- Korzeniewski B & Zoladz JA (2001). A model of oxidative phosphorylation in mammalian skeletal muscle. *Biophys Chem* 92, 17–34.
- Krause K-H (2004). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57, S28–29.
- Ksenzenko M, Konstantinov AA, Khomutov GB, Tikhonov AN & Ruuge EK (1984). Relationships between the effects of redox potential, alpha-thenoyltrifluoroacetone

- and malonate on O₂ and H₂O₂ generation by submitochondrial particles in the presence of succinate and antimycin. *FEBS Lett* 175, 105–108.
- Kunz WS, Kuznetsov AV & Gellerich FN (1993). Mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers is stimulated by caffeine. *FEBS Lett* 323, 188–190.
- Kushmerick MJ, Meyer RA & Brown TR (1992). Regulation of oxygen consumption in fast- and slow-twitch muscle. *Am J Physiol* 263, C598–606.
- Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R & Kunz WS (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 3, 965–976.
- Lampert E, Mettauer B, Hoppeler H, Charloux A, Charpentier A & Lonsdorfer J (1996). Structure of skeletal muscle in heart transplant recipients. *J Am Coll Cardiol* 28, 980–984.
- Lamson DW & Plaza SM (2002). Mitochondrial factors in the pathogenesis of diabetes: a hypothesis for treatment. *Altern Med Rev J Clin Ther* 7, 94–111.
- Lardy HA & Wellman H (1952). Oxidative phosphorylations; rôle of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. *J Biol Chem* 195, 215–224.
- LaStayo PC, Ewy GA, Pierotti DD, Johns RK & Lindstedt S (2003). The positive effects of negative work: increased muscle strength and decreased fall risk in a frail elderly population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58, M419–424.
- Lee Y, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AJ, Willis WT & Powers SK (2012). Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia-reperfusion injury. *Med Sci Sports Exerc* 44, 397–405.
- Lee Y-Y, Kim H-G, Jung H-I, Shin YH, Hong SM, Park E-H, Sa J-H & Lim C-J (2002). Activities of antioxidant and redox enzymes in human normal hepatic and hepatoma cell lines. *Mol Cells* 14, 305–311.
- Lejay A, Meyer A, Schlagowski A-I, Charles A-L, Singh F, Bouitbir J, Pottecher J, Chakfé N, Zoll J & Geny B (2014). Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 50, 101–105.
- 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 & Kelly DP (2005). PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3, e101.
- Lesnefsky EJ & Hoppel CL (2003). Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 420, 287–297.
- Liao JK (2012). Mitohormesis: another pleiotropic effect of statins? *Eur Heart J* 33, 1299–1301.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R & Spiegelman BM (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797–801.
- Lindstedt SL & Hoppeler H (1995). Fatigue and the design of the respiratory system. *Adv Exp Med Biol* 384, 383–391.
- Liu Y, Fiskum G & Schubert D (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80, 780–787.
- Ljubcic V, Joseph A-M, Saleem A, Ugucioni G, Collu-Marchese M, Lai RYJ, Nguyen LM-D & Hood DA (2010). Transcriptional and post-transcriptional regulation of

- mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. *Biochim Biophys Acta* 1800, 223–234.
- Maechler P & Wollheim CB (2001). Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* 414, 807–812.
- Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, Talha S, Kindo M, Pottecher J, Zoll J & Geny B (2012). Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg* 55, 497–505.e1.
- Marnett LJ (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424, 83–95.
- Martou G, O’Blenes CA, Huang N, McAllister SE, Neligan PC, Ashrafpour H, Pang CY & Lipa JE (2006). Development of an in vitro model for study of the efficacy of ischemic preconditioning in human skeletal muscle against ischemia-reperfusion injury. *J Appl Physiol Bethesda Md* 101, 1335–1342.
- Matés JM, Pérez-Gómez C & Núñez de Castro I (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32, 595–603.
- Mathieu-Costello O, Suarez RK & Hochachka PW (1992). Capillary-to-fiber geometry and mitochondrial density in hummingbird flight muscle. *Respir Physiol* 89, 113–132.
- McKelvey TG, Höllwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U & Jones HP (1988). Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am J Physiol* 254, G753–760.
- McLaren PF, Nurhayati Y & Boutcher SH (1997). Stroke volume response to cycle ergometry in trained and untrained older men. *Eur J Appl Physiol* 75, 537–542.
- Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, Hart K, Schinner S, Sethi JK, Yeo G, Brand MD, Cortright RN, O’Rahilly S, Montague C & Vidal-Puig AJ (2003). Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J* 373, 155–165.
- Mereles D, Ehlken N, Kreuzer S, Ghofrani S, Hoepfer MM, Halank M, Meyer FJ, Karger G, Buss J, Juenger J, Holzappel N, Opitz C, Winkler J, Herth FFJ, Wilkens H, Katus HA, Olschewski H & Grünig E (2006). Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation* 114, 1482–1489.
- Meyer K, Steiner R, Lastayo P, Lippuner K, Allemann Y, Eberli F, Schmid J, Saner H & Hoppeler H (2003). Eccentric exercise in coronary patients: central hemodynamic and metabolic responses. *Med Sci Sports Exerc* 35, 1076–1082.
- Morel Y & Barouki R (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 342 Pt 3, 481–496.
- Mortensen SP, Dawson EA, Yoshiga CC, Dalsgaard MK, Damsgaard R, Secher NH & González-Alonso J (2005). Limitations to systemic and locomotor limb muscle oxygen delivery and uptake during maximal exercise in humans. *J Physiol* 566, 273–285.
- Murphy MP (1989). Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 977, 123–141.
- Murphy MP, Echtay KS, Blaikie FH, Asin-Cayuella J, Cocheme HM, Green K, Buckingham JA, Taylor ER, Hurrell F, Hughes G, Miwa S, Cooper CE, Svistunenko DA, Smith RAJ & Brand MD (2003). Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a

- mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron. *J Biol Chem* 278, 48534–48545.
- Murry CE, Jennings RB & Reimer KA (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136.
- Nathan C & Cunningham-Bussell A (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 13, 349–361.
- Nègre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R, Pénicaud L & Casteilla L (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 11, 809–815.
- Nemeth P & Pette D (1981). Succinate dehydrogenase activity in fibres classified by myosin ATPase in three hind limb muscles of rat. *J Physiol* 320, 73–80.
- Nieman DC, Williams AS, Shanely RA, Jin F, McAnulty SR, Triplett NT, Austin MD & Henson DA (2010). Quercetin's influence on exercise performance and muscle mitochondrial biogenesis. *Med Sci Sports Exerc* 42, 338–345.
- Norwood MGA, Bown MJ & Sayers RD (2004). Ischaemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 28, 234–245.
- Nosaka K & Clarkson PM (1996). Variability in serum creatine kinase response after eccentric exercise of the elbow flexors. *Int J Sports Med* 17, 120–127.
- Ogata T & Yamasaki Y (1997). Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *Anat Rec* 248, 214–223.
- Ogilvie RW, Armstrong RB, Baird KE & Bottoms CL (1988). Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically biased exercise. *Am J Anat* 182, 335–346.
- Okado-Matsumoto A & Fridovich I (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276, 38388–38393.
- Pande SV, Siddiqui AW & Gattereau A (1971). Inhibition of long-chain fatty acid activation by -bromopalmitate and phytanate. *Biochim Biophys Acta* 248, 156–166.
- Papanastasiou S, Estdale SE, Homer-Vanniasinkam S & Mathie RT (1999). Protective effect of preconditioning and adenosine pretreatment in experimental skeletal muscle reperfusion injury. *Br J Surg* 86, 916–922.
- Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F & Miroux B (2001a). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 276, 8705–8712.
- Pecqueur C, Couplan E, Bouillaud F & Ricquier D (2001b). Genetic and physiological analysis of the role of uncoupling proteins in human energy homeostasis. *J Mol Med Berl Ger* 79, 48–56.
- Pehowich DJ (1999). Thyroid hormone status and membrane n-3 fatty acid content influence mitochondrial proton leak. *Biochim Biophys Acta* 1411, 192–200.
- Perrey S, Betik A, Candau R, Rouillon JD & Hughson RL (2001). Comparison of oxygen uptake kinetics during concentric and eccentric cycle exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 91, 2135–2142.
- Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A & Suliman HB (2008). Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res* 103, 1232–1240.
- Pilegaard H, Ordway GA, Saltin B & Neufer PD (2000). Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E806–814.

- Pilegaard H, Saltin B & Neufer PD (2003). Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J Physiol* 546, 851–858.
- Pipinos II, Judge AR, Selsby JT, Zhu Z, Swanson SA, Nella AA & Dodd SL (2007). The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction. *Vasc Endovascular Surg* 41, 481–489.
- Podda M, Weber C, Traber MG & Packer L (1996). Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinone. *J Lipid Res* 37, 893–901.
- Ponsot E, Zoll J, N'guessan B, Ribera F, Lampert E, Richard R, Veksler V, Ventura-Clapier R & Mettauer B (2005). Mitochondrial tissue specificity of substrate utilization in rat cardiac and skeletal muscles. *J Cell Physiol* 203, 479–486.
- Poole DC & Mathieu-Costello O (1996). Relationship between fiber capillarization and mitochondrial volume density in control and trained rat soleus and plantaris muscles. *Microcirc N Y N* 1994 3, 175–186.
- Poole RC, Halestrap AP, Price SJ & Levi AJ (1989). The kinetics of transport of lactate and pyruvate into isolated cardiac myocytes from guinea pig. Kinetic evidence for the presence of a carrier distinct from that in erythrocytes and hepatocytes. *Biochem J* 264, 409–418.
- Powers SK & Hamilton K (1999). Antioxidants and exercise. *Clin Sports Med* 18, 525–536.
- Powers SK, Lawler J, Dempsey JA, Dodd S & Landry G (1989). Effects of incomplete pulmonary gas exchange on VO₂ max. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 66, 2491–2495.
- Powers SK, Quindry JC & Kavazis AN (2008). Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 44, 193–201.
- Di Prampero PE, Piñera Limas F & Sassi G (1970). Maximal muscular power, aerobic and anaerobic, in 116 athletes performing at the XIXth olympic games in Mexico. *Ergonomics* 13, 665–674.
- Proske U & Morgan DL (2001). Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J Physiol* 537, 333–345.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M & Spiegelman BM (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829–839.
- Quindry JC, Miller L, McGinnis G, Kliszczewicz B, Irwin JM, Landram M, Urbiztondo Z, Nanayakkara G & Amin R (2012). Ischemia reperfusion injury, KATP channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 113, 498–506.
- Randall WA, Linden BA & Welch H (1947). The inactivation of penicillin with hydroxylamine and its use in the sterility testing of penicillin. *J Bacteriol* 54, 32.
- Reid MB & Durham WJ (2002). Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging. *Ann N Y Acad Sci* 959, 108–116.
- Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM & Jennings RB (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56, 786–794.
- Ricquier D & Bouillaud F (2000). Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol* 529 Pt 1, 3–10.
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR & Blüher M (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8665–8670.

- Rolfe DF & Brown GC (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77, 731–758.
- Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E & Wolfe RR (1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol* 265, E380–391.
- Rooyackers JM, Berkeljon DA & Folgering HTM (2003). Eccentric exercise training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Rehabil Res Int Z Für Rehabil Rev Int Rech Réadapt* 26, 47–49.
- Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino J-P & Dériaz O (2003). Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes* 52, 2874–2881.
- Saks V, Belikova Y, Vasilyeva E, Kuznetsov A, Fontaine E, Keriél C & Leverve X (1995). Correlation between degree of rupture of outer mitochondrial membrane and changes of kinetics of regulation of respiration by ADP in permeabilized heart and liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 208, 919–926.
- Saks VA, Kaambre T, Sikk P, Eimre M, Orlova E, Paju K, Piirsoo A, Appaix F, Kay L, Regitz-Zagrosek V, Fleck E & Seppet E (2001). Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem J* 356, 643–657.
- Saks VA, Vasil'eva E, Belikova YuO null, Kuznetsov AV, Lyapina S, Petrova L & Perov NA (1993). Retarded diffusion of ADP in cardiomyocytes: possible role of mitochondrial outer membrane and creatine kinase in cellular regulation of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1144, 134–148.
- Saltin B, Henriksson J, Nygaard E, Andersen P & Jansson E (1977). Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. *Ann N Y Acad Sci* 301, 3–29.
- Saltin B & Stenberg J (1964). CIRCULATORY RESPONSE TO PROLONGED SEVERE EXERCISE. *J Appl Physiol* 19, 833–838.
- Saraste M (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283, 1488–1493.
- Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P & Bergo MO (2014). Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci Transl Med* 6, 221ra15.
- Schiaffino S (2010). Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol Oxf Engl* 199, 451–463.
- Schiaffino S & Reggiani C (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 76, 371–423.
- Schlagowski AI, Singh F, Charles AL, Gali Ramamoorthy T, Favret F, Piquard F, Geny B & Zoll J (2014). Mitochondrial uncoupling reduces exercise capacity despite several skeletal muscle metabolic adaptations. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 116, 364–375.
- Schwartz DR & Sack MN (2008). Targeting the mitochondria to augment myocardial protection. *Curr Opin Pharmacol* 8, 160–165.
- Sentman M-L, Granström M, Jakobson H, Reaume A, Basu S & Marklund SL (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* 281, 6904–6909.
- Shabalina IG, Kramarova TV, Nedergaard J & Cannon B (2006). Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively. *Biochem J* 399, 405–414.

- Shimano T, Kraemer WJ, Spiering BA, Volek JS, Hatfield DL, Silvestre R, Vingren JL, Fragala MS, Maresh CM, Fleck SJ, Newton RU, Spreuwenberg LPB & Häkkinen K (2006). Relationship between the number of repetitions and selected percentages of one repetition maximum in free weight exercises in trained and untrained men. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* 20, 819–823.
- Spina RJ, Chi MM, Hopkins MG, Nemeth PM, Lowry OH & Holloszy JO (1996). Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 80, 2250–2254.
- St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB & Spiegelman BM (2003). 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.
- Starkov AA (1997). “Mild” uncoupling of mitochondria. *Biosci Rep* 17, 273–279.
- Starkov AA & Fiskum G (2003). Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem* 86, 1101–1107.
- Steiner R, Meyer K, Lippuner K, Schmid J-P, Saner H & Hoppeler H (2004). Eccentric endurance training in subjects with coronary artery disease: a novel exercise paradigm in cardiac rehabilitation? *Eur J Appl Physiol* 91, 572–578.
- Stier A, Bize P, Habold C, Bouillaud F, Massemin S & Criscuolo F (2014). Mitochondrial uncoupling prevents cold-induced oxidative stress: a case study using UCP1 knockout mice. *J Exp Biol* 217, 624–630.
- Suter E, Hoppeler H, Claassen H, Billeter R, Aebi U, Horber F, Jaeger P & Marti B (1995). Ultrastructural modification of human skeletal muscle tissue with 6-month moderate-intensity exercise training. *Int J Sports Med* 16, 160–166.
- Suzuki K, Sato H, Kikuchi T, Abe T, Nakaji S, Sugawara K, Totsuka M, Sato K & Yamaya K (1996). Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 81, 1213–1222.
- Swartz HM, Khan N & Khramtsov VV (2007). Use of electron paramagnetic resonance spectroscopy to evaluate the redox state in vivo. *Antioxid Redox Signal* 9, 1757–1771.
- Tager JM, Wanders RJ, Groen AK, Kunz W, Bohnensack R, Küster U, Letko G, Böhme G, Duszynski J & Wojtczak L (1983). Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett* 151, 1–9.
- Talbot DA, Lambert AJ & Brand MD (2004). Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett* 556, 111–115.
- Talha S, Bouitbir J, Charles A-L, Zoll J, Goette-Di Marco P, Meziani F, Piquard F & Geny B (2013). Pretreatment with brain natriuretic peptide reduces skeletal muscle mitochondrial dysfunction and oxidative stress after ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 114, 172–179.
- Taylor CR, Karas RH, Weibel ER & Hoppeler H (1987). Adaptive variation in the mammalian respiratory system in relation to energetic demand. *Respir Physiol* 69, 1–127.
- Taylor RW & Turnbull DM (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6, 389–402.
- Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, Chafke N, Kretz JG, Piquard F & Geny B (2007). Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 46, 541–547; discussion 547.

- Thompson MM, Nasim A, Sayers RD, Thompson J, Smith G, Lunec J & Bell PR (1996). Oxygen free radical and cytokine generation during endovascular and conventional aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 12, 70–75.
- Tonkonogi M, Walsh B, Tiivel T, Saks V & Sahlin K (1999). Mitochondrial function in human skeletal muscle is not impaired by high intensity exercise. *Pflüg Arch Eur J Physiol* 437, 562–568.
- Turrens JF (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17, 3–8.
- Turrens JF, Alexandre A & Lehninger AL (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237, 408–414.
- Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, van Deursen J, Wieringa B & Ventura-Clapier R (1995). Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J Biol Chem* 270, 19921–19929.
- Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI & Saks VA (1987). Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 892, 191–196.
- Vella CA & Robergs RA (2005). Non-linear relationships between central cardiovascular variables and VO₂ during incremental cycling exercise in endurance-trained individuals. *J Sports Med Phys Fitness* 45, 452–459.
- Vendelin M, Béraud N, Guerrero K, Andrienko T, Kuznetsov AV, Olivares J, Kay L & Saks VA (2005). Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a “crystal-like” pattern. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C757–767.
- Ventura-Clapier R, Garnier A & Veksler V (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovasc Res* 79, 208–217.
- Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E & Anflous K (1998). Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem* 184, 231–247.
- Vergely C, Maupoil V, Clermont G, Bril A & Rochette L (2003). Identification and quantification of free radicals during myocardial ischemia and reperfusion using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch Biochem Biophys* 420, 209–216.
- Vinten-Johansen J, Zhao Z-Q, Jiang R, Zatta AJ & Dobson GP (2007). Preconditioning and postconditioning: innate cardioprotection from ischemia-reperfusion injury. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 103, 1441–1448.
- Vock R, Hoppeler H, Claassen H, Wu DX, Billeter R, Weber JM, Taylor CR & Weibel ER (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. VI. structural basis of intracellular substrate supply to mitochondria in muscle cells. *J Exp Biol* 199, 1689–1697.
- Votyakova TV & Reynolds IJ (2001). DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79, 266–277.
- Wagner PD (1996). Determinants of maximal oxygen transport and utilization. *Annu Rev Physiol* 58, 21–50.
- Walsh B, Tonkonogi M, Söderlund K, Hultman E, Saks V & Sahlin K (2001). The role of phosphorylcreatine and creatine in the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 537, 971–978.
- Wang L, Cherednichenko G, Hernandez L, Halow J, Camacho SA, Figueredo V & Schaefer S (2001). Preconditioning limits mitochondrial Ca(2+) during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H2321–2328.

- Weibel ER, Taylor CR & Hoppeler H (1991). The concept of symmorphosis: a testable hypothesis of structure-function relationship. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10357–10361.
- Weiss JN & Lamp ST (1987). Glycolysis preferentially inhibits ATP-sensitive K⁺ channels in isolated guinea pig cardiac myocytes. *Science* 238, 67–69.
- Wendt IR & Chapman JB (1976). Fluorometric studies of recovery metabolism of rat fast- and slow-twitch muscles. *Am J Physiol* 230, 1644–1649.
- Wiesner RJ, Rüegg JC & Morano I (1992). Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 183, 553–559.
- Winder WW (2001). Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 91, 1017–1028.
- Wisløff U, Helgerud J, Kemi OJ & Ellingsen O (2001). Intensity-controlled treadmill running in rats: VO₂ max) and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1301–1310.
- Wojtczak L & Wieckowski MR (1999). The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 31, 447–455.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC & Spiegelman BM (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115–124.
- Xu X, Decker W, Sampson MJ, Craigen WJ & Colombini M (1999). Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability. *J Membr Biol* 170, 89–102.
- Xu X, Kitamura K, Lau KS, Muallem S & Miller RT (1995). Differential regulation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ influx by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 270, 29169–29175.
- Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T & Hori M (1999). Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med* 189, 1699–1706.
- Yellon DM & Downey JM (2003). Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 83, 1113–1151.
- Zeviani M & Di Donato S (2004). Mitochondrial disorders. *Brain J Neurol* 127, 2153–2172.
- Zoll J, Koulmann N, Bahi L, Ventura-Clapier R & Bigard A-X (2003). Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity. *J Cell Physiol* 194, 186–193.
- Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, Serrurier B, Fortin D, Geny B, Veksler V, Ventura-Clapier R & Mettauer B (2002). Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 543, 191–200.

Etude des adaptations mitochondriales dans le muscle squelettique : Importance de l'hormèse mitochondriale

Les mécanismes impliqués dans les adaptations du phénotype métabolique musculaire au cours de l'exercice physique restent imparfaitement connus. Nous nous sommes intéressés au concept d'hormèse mitochondriale qui se définit comme un stress métabolique activant les voies de signalisation menant à une activation mitochondriale.

En première partie, nous avons validé l'utilisation d'un nouveau système de mesure des échanges gazeux chez le rat au cours de différents exercices sur tapis roulant, et démontré que pour une vitesse de course sous maximale, un exercice en descente sollicite le système cardiovasculaire de façon modérée sans altérer la fonction mitochondriale musculaire, ni augmenter la production de radicaux libres oxygénés.

En deuxième partie, nous avons montré qu'un découplage mitochondrial provoqué par un traitement des rats au 2,3-dinitrophénol (DNP) pendant 3 semaines engendre des adaptations métaboliques menant à l'augmentation de la masse mitochondriale du muscle squelettique. Ces animaux ont une capacité à l'exercice diminuée, malgré une augmentation de leur VO_2max .

Pour finir, nous avons montré qu'un préconditionnement par l'exercice protège la mitochondrie musculaire squelettique des effets délétères de l'ischémie-reperfusion. L'exercice semble activer le métabolisme via un phénomène d'hormèse mitochondriale permettant la protection musculaire. En conclusion, cette thèse nous montre d'une part l'importance de la mitochondrie (aspect quantitatif mais surtout qualitatif) en terme de limitation à l'exercice, et d'autre part nous suggère que l'optimisation du fonctionnement mitochondrial pourrait être une bonne garantie pour pouvoir lutter efficacement contre les stress, notamment oxydatifs, auxquels l'organisme est soumis en (quasi)permanence.

Study of mitochondrial adaptations in skeletal muscle : Role of mitochondrial hormesis

The mechanisms regulating the metabolic phenotype adaptations in skeletal muscle during physical exercise is still unknown.

We studied the mitochondrial hormesis phenomenon that could be defined as a metabolic stress activating the signaling pathways leading to a mitochondrial stimulation (mitochondrial biogenesis).

In the first part, we validated the utilization of a new system determining the gas exchange in rat during a treadmill exhaustive exercise. We showed that a submaximal downhill exercise activate moderately the cardiovascular system, without mitochondrial functional impairments and without any augmentation of the systemic ROS production.

In the second part, we showed that a mitochondrial uncoupling following a dinitrophenol treatment during 3 weeks in rats induced some metabolic adaptations leading to a higher mitochondrial mass in skeletal muscle. The exercise capacity of these animals is reduced whereas the maximal oxygen consumption is higher.

In the last part, we showed that a preconditioning protocol with an acute exercise protected the skeletal muscle mitochondria from the deleterious effects of ischemia-reperfusion. This exercise seems to activate the muscular metabolism via a phenomenon of mitochondrial hormesis activation, allowing an efficient muscular protection.

In conclusion, this thesis shows the importance of the mitochondria in terms of qualitative and quantitative aspects and shows the participation of this organelle in the exercise limitation. Moreover, these works suggest that the optimization of the mitochondrial function could be a good guarantee in order to efficiently fight against oxidative stress at the level of the whole organism.